

SERGIO MARTÍNEZ BELLVER

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL
NÚCLEO INCERTUS ACOPLADA A LA
OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL NÚCLEO
INCERTUS ACOPLADA A LA OSCILACIÓN THETA
HIPOCÁMPICA

SERGIO MARTÍNEZ BELLVER



Doctorado en Neurociencias Básicas y Aplicadas
Dept. de Anatomía y Embriología Humana
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia

2017

Sergio Martínez Bellver: *Estudio de la actividad neuronal del núcleo incertus acoplada a la oscilación theta hipocámpica*, © 2017

DIRECCIÓN DE LA TESIS:

Dra. Ana Cervera Ferri

Dr. Vicent Teruel Martí

Valencia



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Ana Cervera Ferri y Vicent Teruel Martí, doctores por la Universidad de Valencia y Profesores del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN QUE

Sergio Martínez Bellver, licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: Estudio de la actividad neuronal del núcleo incertus acoplada a la oscilación theta hipocámpica.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado a:

Valencia a 17 de mayo de 2017

Dra. Ana Cervera Ferri

Dr. Vicent Teruel Martí

If the human brain were so simple that we could
understand it, we would be so simple that we
could not. *Emerson M. Pugh*

Somewhere, something incredible is waiting to
be known. *Carl Sagan*

The interior of our skulls contains a portal to
infinity. *Grant Morrison*

RESUMEN

Las oscilaciones cerebrales constituyen el sustrato de la integración de la actividad neuronal poblacional. De entre ellas, la oscilación theta se ha descrito como una parte fundamental en la integración de multitud de procesos cognitivos. La generación y modulación de la actividad rítmica theta requiere del funcionamiento conjunto de una red de estructuras distribuidas que incluyen, entre otros, al complejo septo-hipocámpico, distintas regiones hipotalámicas o un grupo de núcleos del tronco del encefalo.

De entre los núcleos troncoencefálicos que modulan la actividad hipocámpica, en los últimos años el núcleo incertus ha adquirido mayor relevancia en el entendimiento del sistema generador theta. Este núcleo no solo está íntimamente conectado con estructuras moduladoras de la actividad theta hipocámpica, sino que presenta actividad oscilatoria theta, coherente con la observada en el hipocampo.

En este trabajo de tesis se intenta ahondar en la relación del núcleo incertus con la modulación theta hipocámpica mediante técnicas electrofisiológicas que permitan discernir las relaciones existentes entre el núcleo incertus y el hipocampo. Para ello, en un primer estudio, se analizó el grado de acoplamiento entre la actividad poblacional theta del núcleo incertus y el hipocampo, haciendo hincapié en la direccionalidad del flujo de información entre ambas estructuras. Por otra parte, se caracterizaron las diferentes poblaciones neuronales del núcleo incertus bajo la activación mantenida del hipocampo. Este estudio se complementó con el estudio de la causalidad entre los distintos tipos neuronales del núcleo incertus y la actividad del hipocampo durante periodos de activación theta transitoria. Finalmente, se comprobó la posibilidad de que el núcleo incertus pudiera generar un reinicio de la fase de la actividad theta de hipocampo con dependencia del septum medial.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el núcleo incertus cumple un papel fundamental en la modulación del ritmo theta hipocámpico. No solo su actividad neuronal se encuentra altamente acoplada a la de hipocampo, sino que este núcleo presenta neuronas rítmicas a frecuencia theta capaces de predecir la actividad oscilatoria de hipocampo. Adicionalmente, el núcleo incertus es capaz de reiniciar la fase de la oscilación theta hipocámpica, lo que le confiere la capacidad de crear nuevas

ventanas de procesamiento. Estos resultados clarifican el papel del núcleo incertus como parte fundamental del circuito theta.

AGRADECIMIENTOS

Para el extraordinario novelista británico Terry Pratchett no es la inteligencia lo que nos hace humanos, sino la imaginación. Y si algo he aprendido en estos años es que la ciencia no es nada sin imaginación. Es la imaginación lo que nos permite ampliar el conocimiento, explorar mas allá de lo establecido, desentrañar los enigmas de lo que se presenta ante nuestros ojos y, como diría James Tiberius Kirk, llegar donde ningún ser humano ha llegado jamás. Y aquí es donde entran mis directores de tesis Ana y Vicent. No sólo me han enseñado todo lo posible acerca de la neurociencia y la vida en un laboratorio. Me han abierto los ojos a lo que podríamos llamar imaginación científica; esa forma de ver las soluciones a los problemas desde ángulos imposibles o, al menos, no euclidianos. Así que Vicent y Ana, tengo que agradecerlos que me hayáis dirigido esta tesis pero, especialmente, que hayáis despertado en mí ese espíritu científico de superación que hace que esta tesis no sea mas que el comienzo de un aprendizaje mucho más largo. Gracias por darme mucho mas de lo que os pedí.

Obviamente, no podría llegar a donde he llegado, ni aprender lo que he aprendido, sin la maravillosa gente con la que he compartido estos últimos seis años. Empezar por Aina, mi compañera de laboratorio, con la que he compartido tantísimas charlas, experimentos, buenos y malos momentos y, aunque me cueste admitirlo, canciones de Rafael.

Joana, de quien atesoro consejos y sugerencias y que, a menudo, sus palabras han sido la ayuda que necesitaba en el momento oportuno. Creo que ni yo mismo soy consciente de lo mucho que he aprendido de ti, Joana. Gracias por enseñarme a ver la vida de otra forma.

Estar en la Facultad de Medicina me ha permitido conocer a gente interesante, fascinante y peculiar. Si alguien reúne esas tres características, y muchas mas, es Lluís (A.K.A. Miguel Ángel Monfort), el que ha sido mi hermano (pequeño) científico durante estos años. Manda narices que, de los dos, tú tuvieras que ser el responsable. No podría haber hecho esto sin ti, Lluís.

Ali, Arantxa y Eva, este camino no habría sido lo mismo sin vosotras. Lo que no habéis podido rellenar con vuestra compañía, vuestro cariño, vuestra simpatía y vuestras anécdotas, lo habéis rellenado con cerveza. Gracias por estos años.

Esta tesis tampoco habría sido posible sin esa parte de mí que nunca salió de Burjassot. Gracias a todos los que habéis estado

conmigo desde unos cuantos kilómetros de distancia, en especial a Hugo y María, los que hace mucho deje de considerar colegas para considerarlos amigos.

Hay tantísima gente a la que agradecer que necesitaría otra tesis para todos ellos: María (mi joven padawan), Tanja, Ana, Sara, Cristian, Isabel, Hanna... Sois unos compañeros de viaje increíbles y me considero muy afortunado de haber podido trabajar a vuestro lado.

No puedo dejar de agradecer a la gente del departamento que me ha ayudado, aconsejado y ha confiado en mí: Mónica, Alfonso, Amparo, Soriano... Gracias.

Sobre todo, quiero agradecer a mis padres y a mi hermano, y a mi familia malagueña, en especial a Inés y Alma, por brindarme la oportunidad de llegar a este momento. Sin vuestro cariño, vuestro apoyo y vuestra paciencia, no habría sido capaz de recorrer ni la décima parte de este camino.

Finalmente quiero dedicar este trabajo a Cecília. Es curioso como empezamos compartiendo carrera, seguimos con el máster, el doctorado y, finalmente, hemos llegado a compartir laboratorio. Lo bueno es que esto nos ha permitido pasar mas tiempo juntos; lo malo ha sido llevarnos los problemas del laboratorio a casa. En cualquier caso, *if we'd go again all the way from the start* seguiría haciendo exactamente lo mismo que he hecho, para poder vivir tanto como he vivido a tu lado. Nada de esto tiene sentido sin ti.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Actividad neuronal	1
1.1.1. Papel de las oscilaciones cerebrales	3
1.2. La oscilación theta hipocámpica	8
1.2.1. Funciones de la oscilación theta hipocámpica	9
1.2.2. Generación de la oscilación theta hipocámpica	14
1.2.3. Modulación extrahipocámpica de la actividad theta	20
1.3. El núcleo incertus	25
1.3.1. Anatomía y neuroquímica	26
1.3.2. Conectividad del núcleo incertus	27
1.3.3. Relación del núcleo incertus con la oscilación theta	28
2. HIPÓTESIS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. Sujetos experimentales	35
3.2. Metodología electrofisiológica	36
3.2.1. Anestesia y cirugía	36
3.2.2. Registro y estimulación neuronal	37
3.2.3. Paradigmas de estimulación	40
3.2.4. Adquisición de la señal	41
3.2.5. Reducción de interferencias	41
3.3. Análisis histológico	41
3.4. Análisis de datos	43
3.4.1. Identificación de potenciales de acción en registros unitarios	44
3.4.2. Agrupamiento de espigas	44
3.4.3. Análisis de la actividad unitaria	46
3.4.4. Análisis tiempo-frecuencia	48
3.4.5. Análisis de la causalidad entre señales neurales	55
3.5. Descripción de los experimentos	57
3.5.1. Experimento 1: Estudio de la conectividad efectiva entre el núcleo incertus y el hipocampo	57
3.5.2. Experimento 2: Estudio de la actividad neuronal del núcleo incertus en presencia de actividad theta hipocámpica	59

- 3.5.3. Experimento 3: Estudio de la causalidad entre las neuronas del núcleo incertus y la actividad oscilatoria de hipocampo 61
- 3.5.4. Experimento 4: Estudio del reinicio de la fase de la oscilación theta hipocámpica tras la estimulación eléctrica del núcleo incertus 63
- 4. RESULTADOS 67
 - 4.1. Estudio de la conectividad efectiva 68
 - 4.1.1. La activación colinérgica del núcleo incertus evoca una actividad theta mantenida en el hipocampo 68
 - 4.1.2. Las actividades del núcleo incertus y el hipocampo incrementan su sincronización tras la infusión de carbacol 72
 - 4.1.3. El carbacol produce un acoplamiento de fases progresivo entre el hipocampo y el núcleo incertus 72
 - 4.1.4. La presencia de oscilaciones mantenidas en hipocampo permite demostrar la conectividad efectiva entre el propio hipocampo y el núcleo incertus 74
 - 4.2. Caracterización de la actividad neuronal 79
 - 4.2.1. En condiciones basales se identifican los dos tipos de neuronas descritas en el núcleo incertus 80
 - 4.2.2. Los diferentes paradigmas de estimulación permiten evidenciar un nuevo grupo neuronal en el núcleo incertus 80
 - 4.2.3. Las neuronas tipo I del núcleo incertus presentan actividad no rítmica en presencia de actividad theta hipocámpica 85
 - 4.2.4. Las neuronas tipo II del núcleo incertus muestran una actividad a alta frecuencia durante los periodos theta 88
 - 4.2.5. Las neuronas tipo III del núcleo incertus disparan regularmente a frecuencia theta durante la activación hipocámpica 88
 - 4.2.6. Las neuronas tipo III del núcleo incertus se acoplan a la oscilación theta hipocámpica 91
 - 4.3. Causalidad entre el núcleo incertus y el hipocampo 104
 - 4.3.1. La actividad theta hipocámpica evocada por *tail pinch* es dependiente del núcleo incertus 104

4.3.2.	Las neuronas del núcleo incertus presentan relaciones causales significativas con la actividad del hipocampo	105
4.4.	Reinicio de fase en el hipocampo	111
4.4.1.	La estimulación eléctrica del núcleo incertus produce un reajuste de la oscilación theta de hipocampo	111
4.4.2.	La inactivación del septum medial evita el reinicio de la actividad theta de hipocampo mediado por el núcleo incertus	114
5.	DISCUSIÓN	117
5.1.	Acoplamiento neuronal de NI con hipocampo	118
5.1.1.	El núcleo incertus como activador de la red theta hipocámpica	119
5.1.2.	Extendiendo la clasificación de las neuronas del núcleo incertus	121
5.1.3.	Las neuronas tipo III están altamente acopladas a la oscilación theta hipocámpica	122
5.1.4.	Las neuronas del núcleo incertus proporcionan un amplio rango de respuestas dependientes del estado de activación del cerebro	122
5.2.	Conectividad efectiva NI-hipocampo	124
5.2.1.	El núcleo incertus es indispensable para la generación sensorial de ritmicidad theta en el hipocampo	125
5.2.2.	Acoplamiento oscilatorio entre hipocampo y núcleo incertus	126
5.2.3.	Causalidad entre el hipocampo y el núcleo incertus	127
5.3.	Reinicio de la fase theta	129
5.4.	Función del núcleo incertus	132
5.4.1.	El núcleo incertus y el estrés	133
5.4.2.	El núcleo incertus y el nivel de activación	136
6.	CONCLUSIONES	141
	BIBLIOGRAFÍA	143

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Página del cuaderno de Berger	2
2.	Contexto espacio-temporal	11
3.	Perfil típico de sueño en humanos	13
4.	Circuito trisináptico hipocámpico	18
5.	Esquema de proyecciones del núcleo incertus en el cerebro de rata	28
6.	Patrón de disparo de las neuronas de NI	30
7.	La lesión del núcleo incertus elimina el ritmo theta evocado por la estimulación eléctrica de RPO	31
8.	Situación de los puntos de referencia en el cráneo	38
9.	Identificación de potenciales de acción	45
10.	Diferentes ventanas de convolución	49
11.	Fundamentos del análisis wavelet	50
12.	Test de uniformidad de fases de Rayleigh	54
13.	Estudio del reinicio de la fase de una oscilación	64
14.	Análisis tiempo-frecuencia de los potenciales de campo local de hipocampo y núcleo incertus tras el efecto de la infusión de carbacol	69
15.	Medida temporal de la actividad theta	71
16.	Análisis de coherencia wavelet	73
17.	Fases de la oscilación theta	75
18.	Evolución de las fases de la oscilación theta	76
19.	Causalidad de Granger entre el hipocampo y el núcleo incertus	77
20.	Porcentaje de causalidad entre el hipocampo y el núcleo incertus	78
21.	Localización de los electrodos	81
22.	Registros en crudo de neuronas tipo III y el LFP de hipocampo	82
23.	Evolución temporal de la tasa de disparo y CV	86

24.	Tasa de disparo y CV	87
25.	Registros de neuronas tipo I y II y el LFP de hipocampo	89
26.	Efecto del tail pinch en hipocampo y NI	92
27.	Espectrograma wavelet promedio	93
28.	Intervalos interespiga de las distintas neuronas	95
29.	Espectrogramas de hipocampo y NI tipo I	96
30.	Espectrogramas de hipocampo y NI tipo II	97
31.	Espectrogramas de hipocampo y NI tipo III	98
32.	Evolución temporal de una neurona tipo III	99
33.	TPI y STT	100
34.	PLV tipo III	102
35.	Información mutua	104
36.	Respuesta theta evocada en hipocampo	105
37.	Análisis de la causalidad	107
38.	Causalidad	108
39.	Relaciones causales temporales	110
40.	Verificación histológica de hipocampo y MS/DB	111
41.	Verificación histológica de NI	112
42.	Efecto del pulso eléctrico en NI	113
43.	Efecto de la estimulación de NI sobre las fases del theta de hipocampo	116
44.	Esquema de interacciones causales	129
45.	Esquema del acoplamiento debido al reinicio de la fase	132
46.	Esquema de la activación hipocámpica	137

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Número de ejemplares empleado en los distintos experimentos	35
2.	Coordenadas de referencia, tomadas desde Bregma	37

3. Parámetros de acoplamiento de fases entre las oscilaciones theta de NI e hipocampo para los periodos basal, transición y theta estacionario (Theta). 74
4. Patrón de disparo de los distintos tipos neuronales de NI 85
5. Evolución de los valores de acoplamiento de fase de las neuronas tipo III del NI, en periodos de 10 s, durante la estimulación sensorial (estim) y el periodo post-estimulación (post). 101

ABREVIATURAS

4V	cuarto ventrículo
5-HT	serotonina
ACH	autocorrelation histogram
AChE	acetilcolinesterasa
ADF	prueba de Dickey-Fuller aumentada
AHi	área amigdalohipocámpica
APN	núcleo pretectal anterior
BST	núcleo del lecho de la stria terminalis
CA	cornu ammonis
CB	calbindina
CCK	colecistoquinina
CGA	central gray pars alfa
CGO	central gray pars O
CL/CM	núcleos talámicos centrolateral/centromedial
CNO	clozapina-N-óxido
Co	núcleo de la amígdala cortical
CR	calretinina
CRH	hormona liberadora de corticotropina
CV	coeficiente de variación
CWT	continous wavelet transform
DB	núcleo de la banda diagonal
DG	giro dentado
DR	núcleo dorsal del rafe
DT	núcleo del tegmento dorsal
DTF	función de transferencia directa

EC	corteza entorrinal
EPSP	excitatory postsynaptic potential
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	glutamato descarboxilasa
HPC	hipocampo
IC	colículo inferior
IPN	núcleos interpedunculares
IPSP	inhibitory postsynaptic potential
ISIH	interspike interval histogram
KPSS	prueba de Kwiatkowski-Phillips-Schmidt-Shin
LDT	núcleo laterodorsal tegmental
LFP	local field potential
LHA	área posterior hipotalámica
LHb	habénula lateral
LPO	área lateral preóptica
LS	núcleos laterales septales
LTP	long term potentiation
MD	núcleo talámico mediodorsal
MI	mutual information
mlf	fascículo longitudinal medial
MR	núcleo medial del rafe
MS/DB	septum medial/ banda diagonal de Broca
NI	núcleo incertus
NIc	núcleo incertus pars compacta
NId	núcleo incertus pars dissipata
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
PAG	sustancia gris periacueductal
PCA	principal components analysis
PDT	núcleo tegmental posterodorsal

PFA	paraformaldehído
PH	hipotálamo posterior
PLV	phase locking value
PPT	núcleo del tegmento pedunculopontino
PR	núcleo del rafe pontino
PVT	núcleo talámico paraventricular
REM	rapid eye movement
RI	rythmicity index
RLX₃	relaxina-3
RPO	núcleo reticular pontino oral
SC	colículo superior
SDF	spike density function
SEM	error estándar de la media
SFi	núcleo septofimbrial
SLM	stratum lacunosum moleculare
SO	stratum oriens
STFT	short time Fourier transform
STT	shared theta time
SUB	subículum
SUM	núcleo supramamilar
SWS	slow-wave sleep
TP	tail pinch
TPI	theta propensity index
VTA	área ventral tegmental

INTRODUCCIÓN

En 1924, el neurólogo alemán Hans Berger fue capaz de registrar el primer encefalograma humano, describiendo una actividad eléctrica oscilatoria en la parte occipital del cráneo de sus pacientes (figura 1). En palabras de Berger:

El electroencefalograma representa una curva continua con oscilaciones continuas en las que se pueden distinguir ondas largas de primer orden con una duración media de 90 ms y unas pequeñas de segundo orden con una duración de 35 ms

Berger llamó al ritmo de larga amplitud registrado en pacientes despiertos con los ojos cerrados, ritmo alfa, mientras que a las oscilaciones rápidas que aparecían al abrir los ojos, recibieron la nomenclatura de ondas beta (Berger, 1929).

Si bien es verdad que las oscilaciones cerebrales se habían descrito anteriormente en distintos mamíferos no humanos (Caton, 1875), fue a partir de los experimentos de Berger cuando los estudios electrofisiológicos cobraron relevancia en el ámbito de las neurociencias. A día de hoy, se han descrito desde oscilaciones ultralentas de unos 0.05 Hz hasta ritmos rápidos de 600 Hz. Esta clasificación en bandas de frecuencias tiene, además, una correlación funcional, ya que diferentes actividades oscilatorias pueden atribuirse a diferentes estados cerebrales dependientes de la recepción de estímulos o de la conducta (Buzsáki et al., 2013).

1.1 ACTIVIDAD NEURONAL

El conjunto de la actividad eléctrica de las poblaciones neuronales de una región y de sus aferencias genera una señal registrable, observada como un patrón oscilatorio en el campo eléctrico extracelular (Akam y Kullmann, 2012). La naturaleza de las células nerviosas conlleva señales eléctricas que son el fundamento del procesamiento de información neuronal. La generación y transmisión de estas señales dependen, en última instancia, de los cambios del potencial de reposo de la membrana celular.

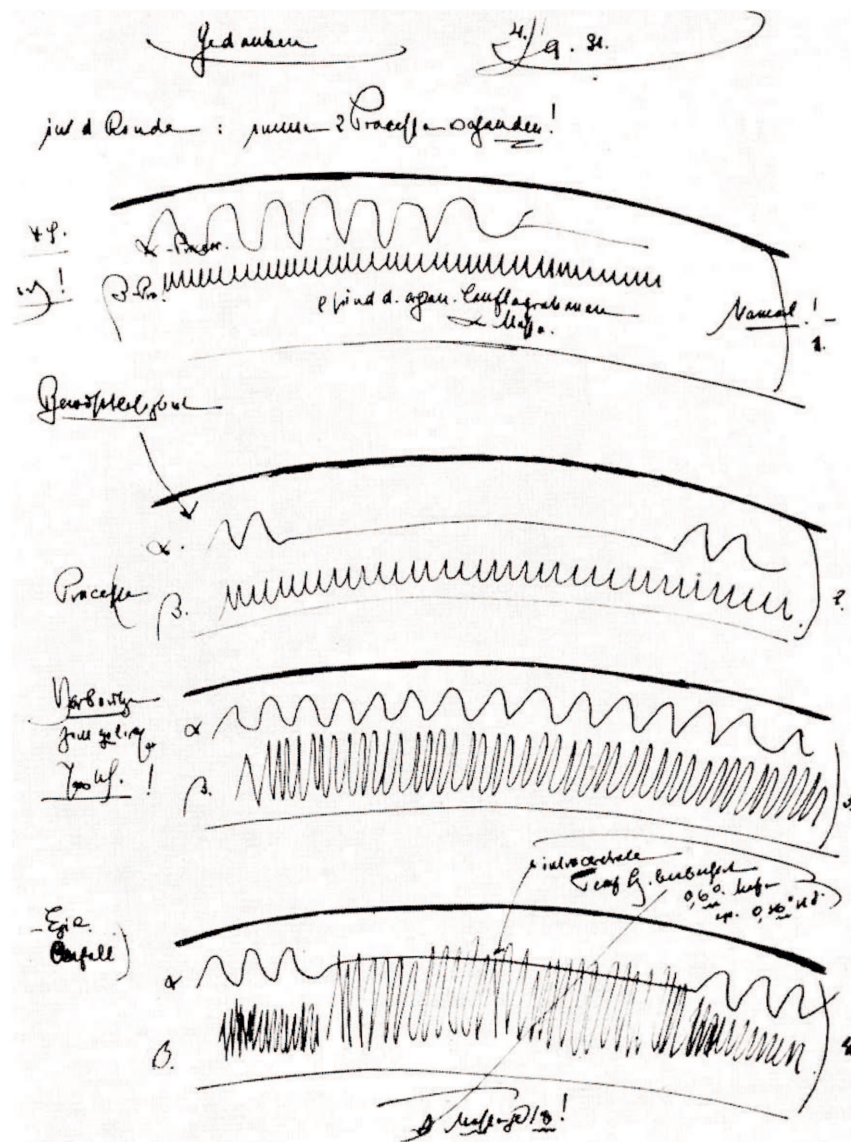


Figura 1: Página del cuaderno de Hans Berger donde se representa su teoría de que la actividad alfa está asociada a procesos mentales activos, mientras que la actividad beta se encuentra asociada con procesos metabólicos corticales (Millett, 2001).

La célula nerviosa presenta una concentración plasmática iónica, muy diferente al medio extracelular. Esta circunstancia provoca una diferencia de potencial eléctrico de unos -70 mV, que es la base de la comunicación interneuronal y por tanto de la codificación de la información nerviosa.

Las señales neuronales consisten en impulsos eléctricos cortos, llamados potenciales de acción, con una amplitud de aproximadamente 100 mV y una duración típica de 1~2 ms. Una cadena de potenciales de acción emitidos por una sola neurona es denominada un *tren de espigas*, una secuencia de eventos estereotipados que se producen a intervalos regulares o irregulares. Así, el potencial de acción es la unidad elemental de la transmisión de la señal nerviosa, el cual genera un flujo iónico electroquímico en el espacio extracelular de la neurona, responsable directo de la generación de un potencial de campo local (*Local Field Potential*, LFP). Se debe tener en cuenta que los procesos sinápticos tienen más peso en los LFPs que los potenciales de acción neuronales. Esto es debido a que los potenciales postsinápticos son fenómenos más duraderos en el tiempo, en comparación con los potenciales de acción, lo que permite su sumación lineal. Por tanto, el LFP refleja la actividad eléctrica de un gran número de neuronas en un campo esférico alrededor del electrodo de registro (Mitzdorf, 1985; Juergens et al., 1999). Por tanto, los potenciales de campo no sólo son reflejo de la actividad local, sino también del circuito en el que ésta se integra, lo que le confiere gran interés en el campo de estudio de la neurociencia de sistemas.

1.1.1 Papel de las oscilaciones cerebrales

Puesto que las oscilaciones reflejan la actividad eléctrica que se da en el seno de redes neuronales, se puede considerar que los ritmos cerebrales componen un sistema de comunicación neural. Podemos pensar en los procesos oscilatorios como el correlato instantáneo del trasiego de información entre distintas áreas cerebrales. El papel último de una oscilación dependerá del circuito en el que se encuentren integradas las neuronas que participan de dicha oscilación. No obstante, de acuerdo a Buzsáki y Draguhn (2004) todas las oscilaciones tendrían como funciones generales el permitir la integración de poblaciones neuronales distribuidas e incorporar la información temporal a la aportada por los ensamblajes neuronales. Las oscilaciones cerebrales tienen un papel fundamental también en los procesos cognitivos, dado que proporcionan las condiciones para que se den procesos de plasticidad y selección de estímulos, con lo que esto implica para la creación de nuevos recuerdos, y participan en su consolidación y recuperación.

1.1.1.1 Plasticidad y selección de estímulos

Las redes neuronales oscilan en respuesta a los estímulos entrantes en las neuronas que las componen. La frecuencia de la oscilación respuesta es la resultante de dos efectos opuestos: por un lado, la capacitancia y conductancia de las membranas plasmáticas neuronales actúan a modo de filtro pasa-bajo (*low-pass filter*), atenuando la entrada de señales de alta frecuencia. Por otro, la activación de canales dependientes de voltaje hace las veces de filtro pasa-alto (*high-pass filter*), evitando la entrada de señales de baja frecuencia (Llinas, 1988). La combinación de filtros permite generar otro tipo de filtrado que modula la respuesta a las oscilaciones, tales como los filtros pasa-banda, que permiten la entrada a un rango determinado de frecuencias, o los filtros de parada (*notch*), que eliminan ciertas frecuencias de una oscilación compleja (Marshall et al., 2002; Gupta, 2000; Thomson y West, 2003). Así pues, esta resonancia oscilatoria permite a las neuronas admitir solo aquellos *inputs* que cumplan unas características de frecuencia dadas. La modulación de los componentes responsables de la ritmicidad neuronal, lleva a la célula al procesamiento oportuno de los estímulos entrantes.

Tan importante como las propiedades reales (frecuencia y potencia) de los *inputs* es su temporalidad. La sincronización de la actividad de una población de neuronas se consigue mediante el acoplamiento de sus unidades a una determinada fase de la oscilación poblacional, lo que proporciona una manera eficiente de codificar la información cerebral. La periodicidad proporcionada por la fase de una oscilación permite la apertura de ventanas temporales que facilitan la respuesta de la neurona. Si los estímulos están temporalmente alineados, es decir, se presentan en una fase preferente de la oscilación, se produce una respuesta por parte del sistema, mientras que si no lo están, son ignorados o se genera una respuesta retardada (Hutcheon y Yarom, 2000).

Un buen ejemplo de la importancia del acoplamiento estímulo-fase puede observarse en el trabajo de Huerta y Lisman (1995), donde la aplicación de trenes de estimulación eléctrica suministrados en los picos de la oscilación theta de hipocampo produce potenciación a largo plazo de la eficacia sináptica, mientras que, la aplicación de los mismos estímulos en los valles de la onda, produce una depresión a largo plazo.

Por tanto, se puede concluir que la fase de la oscilación es fundamental para la entrada de información (Buzsáki, 2004; Schroeder y Lakatos, 2009; Giraud y Poeppel, 2012). De esta manera, la fase de la oscilación, y por tanto el potencial eléctrico local del entorno de la neurona, condiciona su procesamiento (Milton y Pleydell-Pearce, 2016). Así pues, la modulación de la fase de una oscilación, por ejemplo en respuesta a un estímulo entrante

en el sistema, puede generar una adaptación que permita modificar las propiedades mismas de la oscilación para mejorar la computación de dicho estímulo. Se ha propuesto que el proceso de reinicio de la fase pueda ser clave en el mecanismo de control y facilitación de la codificación de estímulos en poblaciones neuronales (Vолоh y Womelsdorf, 2016).

1.1.1.2 *Acoplamiento de poblaciones neuronales*

Las redes neuronales se presentan como un sistema de computación distribuida que optimiza la generación de respuestas cognitivas o comportamentales. No obstante, todo sistema computacional requiere de eficiencia en la transmisión de información (Laughlin y Sejnowski, 2003). Los circuitos neurales distribuidos emplean las oscilaciones de diferentes frecuencias como sustrato computacional y comunicativo, controlando así las funciones integrativas cognitivas y sensoriales, permitiendo la aparición de funciones complejas por la superposición y coordinación de los distintos circuitos oscilatorios (Başar et al., 2001). Los procesos involucrados abarcan mecanismos de entrada sensorial, percepción, movimiento y procesos cognitivos relativos a la atención, el aprendizaje y la memoria.

La información en el cerebro es procesada, transferida y almacenada por células que, sin necesidad de formar parte de una misma red neuronal, pueden sincronizarse transitoriamente. La habilidad de estos conjugados neuronales para sincronizarse depende de la potencia del acoplamiento y de la distribución de frecuencias (Mirollo y Steven, 1990). Mientras las frecuencias de los osciladores permanezcan similares, la sincronía puede mantenerse aun en ausencia de fuertes conexiones sinápticas. Por ejemplo, se ha estudiado como las distintas propiedades de una imagen pueden ser procesadas por varios complejos neuronales distribuidos en diferentes regiones corticales, conectados entre sí por la presencia de una oscilación gamma común (Engel et al., 2001). Se ha visto que el espacio de tiempo necesario para sincronizar poblaciones neuronales transitorias se amolda al ciclo gamma (Steriade y Contreras, 1996; Womelsdorf y Fries, 2007; Kucewicz et al., 2014), permitiendo la generación de una oscilación suficientemente larga para la consolidación de un proceso cognitivo (Llinas y Ribary, 1993; Kahana et al., 2001; Varela et al., 2001; Harris et al., 2003). Otro ejemplo de coordinación mediada por acoplamiento oscilatorio lo tenemos en la evocación de recuerdos mediada por la sincronización a frecuencias theta en áreas límbicas, corticales y subcorticales (Hasselmo, 2005).

En todos los casos, el ciclo de la oscilación parece ser clave para la generación de ventanas temporales que permitan los ensamblajes neuronales. Así, el periodo de la oscilación delimitaría el

marco temporal durante el que los eventos serían incorporados a un mismo ensamblaje neuronal. De esta manera, oscilaciones de frecuencias mayores, y por tanto de menor periodo, permitirían la integración conjunta de eventos rápidos, mientras que oscilaciones más lentas permitirían la entrada de información durante periodos de tiempo mas extensos. La velocidad de conducción axonal determina por tanto que las ondas rápidas se asocien a poblaciones neuronales cercanas, locales, en las que el trasiego de información puede darse a alta velocidad y, sin embargo, oscilaciones lentas permitan integrar información procedente de áreas distantes (Buzsáki y Watson, 2012). El acoplamiento entre oscilaciones de distinta frecuencia permite un mayor grado en el refinamiento de la computación y transmisión de la información, optimizando los procesos asociativos a diferentes escalas espacio-temporales.

1.1.1.3 *Información derivada de la fase de la oscilación*

Como se ha explicado anteriormente, la fase de la oscilación es un factor determinante para el procesamiento de información. La propia fase aporta un valor computacional añadido al incluir el componente temporal en la sucesión de eventos. Dicho de otra manera, no existe una ubicación anatómica concreta para la percepción del tiempo, sino que existen múltiples osciladores distribuidos con distintas escalas temporales que pueden sincronizarse para permitir el procesamiento de la información temporal. Esta información temporal es necesaria para poder establecer relaciones de coincidencia y de sucesión.

En la percepción del tiempo, a nivel neuronal, cobra especial relevancia el fenómeno de la precesión de fase. El acoplamiento temporal de la actividad unitaria a una oscilación determinada viene dado por la combinatoria entre las dinámicas oscilatorias de la red neuronal y los estímulos externos a la misma. Dada una neurona que presenta excitación dendrítica e inhibición somática durante un proceso oscilatorio, si la inhibición permanece constante pero la despolarización dendrítica incrementa, el disparo neuronal se alcanzará progresivamente en fases más tempranas del ciclo oscilatorio (Buzsáki et al., 1995). Este fenómeno se conoce como precesión de fase y, en términos generales, la potencia del acoplamiento es proporcional a esta precesión de fase (Mirolo y Steven, 1990). Este mecanismo puede ser empleado como fuente de almacenamiento de información a corto plazo (Lisman y Idiart, 1995).

El primer ejemplo descrito de este fenómeno lo encontramos en el trabajo de O'Keefe (1993) sobre el hipocampo. Se registraron neuronas piramidales de hipocampo de ratas mientras caminaban por una pista recta. Los disparos de estas neuronas

mostraron precesión de fase en la oscilación theta de hipocampo conforme los animales se acercaban al centro de la pista, de manera independiente al tamaño o forma del camino o a la velocidad del animal. Como consecuencia, la posición futura del animal puede ser predicha por la posición relativa de las espiigas en la oscilación theta (Dragoi et al., 2003). Estas neuronas fueron denominadas *place cells* al responder dependiendo de la posición del animal en el espacio.

1.1.1.4 Consolidación de la memoria

La consolidación de la memoria implica el refuerzo de conexiones neuronales creadas durante la vigilia mediante la reactivación de circuitos activados por la experiencia, además de la independización de los ensamblajes cortico-corticales respecto de sus nodos hipocámpicos con la transformación de memoria de corto a memoria a largo plazo. A nivel celular, esto se traduce en procesos de plasticidad sináptica, coordinados por las oscilaciones cerebrales.

Las oscilaciones periódicas son inherentes a los sistemas neuronales estables. De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado que la naturaleza oscilatoria de una red persiste aún en ausencia de estímulos externos (Reyes, 2003). El patrón oscilatorio depende tanto de la naturaleza de la organización neuronal (Briggs, 2010) como de las condiciones iniciales del oscilador (Glass, 2001). Sin perturbación de ningún tipo, la dinámica osciladora se repetirá indefinidamente (Lisman y Idiart, 1995). Durante el sueño, los patrones oscilatorios cerebrales experimentan modificaciones asociadas a la consolidación de la memoria.

El sueño es esencial para la consolidación de la memoria (Diekelmann, 2014). El estado basal del encéfalo durante el sueño es una compleja organización oscilatoria, sobretodo en el sistema tálamo-cortical (Steriade y Contreras, 1996; Steriade, 2001; Steriade y Timofeev, 2003), que refleja un patrón de actividad neuronal creado por la experiencia consciente previa (Destexhe y Sejnowski, 2003), o a conexiones entre el hipocampo y el neocórtex que contribuyen a la estabilización de los recuerdos. Durante la fase REM (*Rapid Eye Movement* del sueño, en el hipocampo y la corteza entorrinal se reproducen patrones de activación neuronal en células que conforman el mapa cognitivo (*place cells* y *grid cells*) adquirido durante la vigilia. Esta reactivación promueve la potenciación sináptica de las neuronas implicadas lo que se traduce, en última instancia, en la generación de nuevos recuerdos relativos a la modificación del mapa cognitivo previo (Wilson y McNaughton, 1994). El fortalecimiento de las sinapsis requiere de acoplamientos precisos entre oscilaciones theta y gamma (Lisman, 2005; Montgomery et al., 2008; Sirota et al., 2008; Scheff-

[zük et al., 2011](#)). Adicionalmente, durante el sueño no-REM se producen acoplamientos entre oscilaciones que reactivan circuitos tálamo-corticales e hipocámpico-neocorticales ([Mölle et al., 2006](#); [Clemens et al., 2007](#); [Staresina et al., 2015](#)).

1.2 LA OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA

En los vertebrados, los estados de alta actividad neural se caracterizan por la activación de las vías colinérgicas, desincronización cortical y presencia de oscilaciones theta en el hipocampo ([Zhang et al., 2010](#); [Buzsáki et al., 2003](#)). El ritmo theta hipocámpico es un patrón oscilatorio estable, de 4 a 10 Hz en humanos (en rata suele describirse de 3 a 12 Hz), observable durante durante los procesos cognitivos de alta carga mnemónica que ocurren tanto en la vigilia activa como en la fase REM del sueño ([Battaglia et al., 2011](#); [Colgin, 2013](#)).

La actividad theta se ha estudiado ampliamente desde su descubrimiento en el hipocampo de conejo por Jung y Kornmuller (1938). El escepticismo inicial sobre la posibilidad de que estas grandes ondas regulares se generasen en el cerebro fue superado cuando Green y Arduini (1954) mostraron que el patrón theta correlacionaba con la desincronización neocortical, lo que sugirió que la oscilación theta representaba el patrón de actividad, o *arousal*, del hipocampo. Más tarde, se hicieron intentos de correlacionar la ritmicidad theta con aspectos relacionados con los procesos de aprendizaje: Adey *et al.* (1960) describieron cambios en las frecuencias theta durante tareas de aprendizaje; y Grastyan (1959) encontró ondas theta durante procesos de orientación relacionados con comportamientos de recompensa. Los estudios realizados por Gray (1971) sugirieron que algunas frecuencias de la actividad theta del hipocampo en la rata también podían darse en asociación con reacciones a la falta de recompensa.

Estas diferencias de interpretación de los diferentes laboratorios llevaron a la especulación de que el correlato conductual del ritmo theta varía de una especie a otra y quizás de una tarea a otra. En este sentido Vanderwolf llevó a cabo cuidadosas observaciones para correlacionar los diferentes patrones de actividad oscilatoria del hipocampo con procesos estrictamente conductuales ([Vanderwolf, 1969](#)). En su primera descripción de la oscilación theta asociada al movimiento postuló que «*la actividad rítmica lenta en el hipocampo es un mecanismo organizativo de los actos motores voluntarios*». No obstante, no se dilucidó si esta oscilación se presentaba en procesos de exploración, de *arousal* o aquellos relacionados con la memoria.

Así, los cambios en la frecuencia theta vistos por Adey, por ejemplo, tienden a estar correlacionados con los cambios en el

comportamiento motor durante el curso del aprendizaje. En varias especies de roedores, Vanderwolf *et al.* observaron que la actividad theta se asociaba con lo que él llamó «los movimientos voluntarios», mientras que las ondas lentas de gran amplitud aparecían durante patrones estereotipados de acción fija. Su observación posterior de que había dos tipos de theta, cada con diferentes correlatos comportamentales (Kramis *et al.*, 1975), correlacionándose uno con el *arousal* o atención, ya sea en asociación con el movimiento o inmovilidad, y el otro con el movimiento exploratorio. Estos dos tipos de ritmicidad theta se expresan en grados diferentes en diferentes especies y dependen además de diferentes entradas neuromoduladoras. Además, el ritmo theta también se puede registrar durante el sueño paradójico, o fase REM (Winson, 1972; Buzsáki *et al.*, 2003; Jouvet, 1969), y es por ello que a este periodo del sueño se le atribuye un posible papel en la memoria y el aprendizaje (Vertes y Kocsis, 1997; Berry y Seager, 2001; Diekelmann, 2014).

1.2.1 Funciones de la oscilación theta hipocámpica

Numerosos estudios han intentado dar un papel funcional a la oscilación theta (para revisión, Buzsáki 2005). Trabajos realizados en el hipocampo de ratas han permitido sugerir tres posibles funciones para la ritmicidad theta, acordes a los distintos correlatos comportamentales observados. En todos los casos, la actividad theta parece presentar un papel en la función integrativa del cerebro, permitiendo que el hipocampo alcance un estado activo de computación cognitiva. En primer lugar, las ondas theta actúan como mecanismo de sincronización global, esencialmente bloqueando la formación hipocámpica en un modo de procesamiento global y de organización de la actividad en cada región del hipocampo con respecto a las otras, así como con otras regiones corticales o subcorticales. Registros simultáneos del LFP en diferentes lugares del hipocampo han demostrado que la actividad theta en zonas particulares, por ejemplo en la capa piramidal CA1, es sincrónica y coherente con otras áreas de la formación hipocámpica (Mitchell y Ranck, 1980; Fox *et al.*, 1986; Bullock *et al.*, 1990). De este modo, si dos células disparan patrones sistemáticamente relacionados con los ciclos theta locales, es probable que tengan relaciones temporales sistemáticas entre sí, incluso si ambas neuronas se encuentran separadas en el propio hipocampo. Aunque el estudio del ritmo theta se ha centrado en la formación hipocámpica, áreas sensoriales y de motivación también se ponen bajo su dominio, evidenciando la existencia de un sistema generalizado oscilatorio organizador de la actividad

de áreas dispares del encéfalo (Başar et al., 2001; Kirk y Mackay, 2003; Benchenane et al., 2010).

Una segunda función atribuida al ritmo theta, es la de proporcionar un sistema temporal periódico para la sincronización de las espigas de las neuronas del hipocampo. La relación de fase de cada célula piramidal medida frente a la actividad theta concurrente no es constante sino que puede variar de un ciclo al siguiente (O'Keefe y Recce, 1993; Skaggs et al., 1996). Registros unitarios demostraron una relación entre el patrón de disparo rítmico a frecuencia theta de las neuronas de hipocampo y la localización del animal en el espacio (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Estas neuronas fueron llamadas «células de lugar» (*place cells*, ver referencia anterior en pag. 7) y varían su lugar de disparo en la fase de la oscilación theta según la posición del animal en el espacio (precesión de fase) (O'Keefe y Recce, 1993; Sato y Yamaguchi, 2005). Las *place cells* proporcionarían información allocéntrica, independiente de la orientación del eje corporal. Basándose en estos hallazgos, se puede considerar al hipocampo como el sustrato de la navegación, ya que proporcionaría un mapa cognitivo capaz de representar al individuo en el espacio (O'Keefe y Burgess, 2005). Este mapa neural se ha ampliado posteriormente, con la incorporación de la información de un sistema de escala (*grid cells* de la corteza entorrinal) y de orientación de la cabeza (*head direction cells*) que, en conjunto, proporcionan un marco óptimo para el procesamiento de las relaciones espaciales con el entorno (Sargolini et al., 2006; Moser et al., 2008).

Con el descubrimiento de la precesión de fase, la variable tiempo entró en la ecuación de la oscilación theta, ya que abría una puerta al entendimiento de la memoria episódica mediante la actividad unitaria neuronal (Buzsáki, 2006). Numerosos estudios han intentado demostrar el acoplamiento temporal del ritmo theta hipocámpico en distintos procesos fisiológicos (Pedemonte et al., 1999; Hasselmo, 2008). La contribución al establecimiento de relaciones temporales ha sido considerada fundamental para la creación de asociaciones entre eventos que subyace a la formación de memoria (Teschke y Karhu, 2000; Hasselmo, 2005; Vertes, 2005). La precesión de fase implica que la información debe ser codificada y transmitida en paquetes que permitan su integración en el sistema. Por lo tanto, se hace necesaria la presencia de una estructura moduladora temporal, tal como el hipocampo, que permita la integración del disparo individual de las neuronas en fases concretas de las oscilaciones del potencial de campo local (Dragoi y Buzsáki, 2006; Hasselmo, 2008) (figura 2). Se ha postulado que la precesión de fase en la oscilación theta puede ser empleada por el hipocampo y otras estructuras para acoplar su actividad neuronal. La actividad de las neuronas piramida-

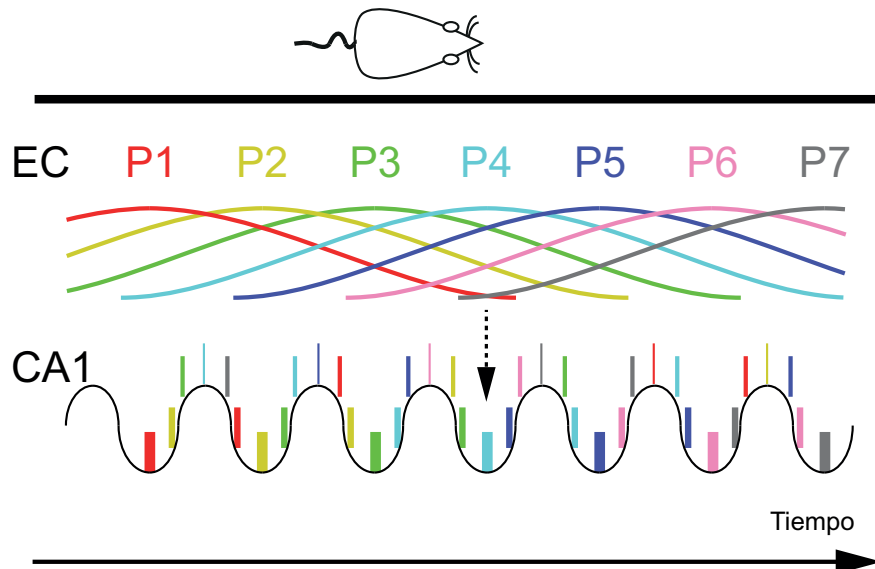


Figura 2: Contexto espacio temporal. Cada posición (P1 a P7) se encuentra definida por el conjunto celular de la corteza entorrinal, más activo en el valle del ciclo theta registrado en CA1. La anchura de las barras indica la tasa de disparo de cada agregado. Ya que cada agregado neuronal contribuye a la representación de múltiples lugares, diversos conjuntos se coactivan en cada ciclo theta. De esta forma, la posición del animal en cada momento se encuentra representada por el conjunto de máxima actividad durante el valle del ciclo theta. Así, la oscilación theta establece un marco temporal que contextualiza, no solo la situación presente, sino representaciones pasadas o futuras. Adaptada de Buzsáki (2005).

les y sus interneuronas asociadas podrían acoplarse a diferentes fases y a distintas frecuencias para formar agrupaciones neuronales acopladas bajo una misma oscilación (Buzsáki, 2002).

Numerosas evidencias muestran la relación entre las oscilaciones theta y la transmisión de información durante los procesos sensoriales (Colgin, 2013) y atencionales (Ekstrom et al., 2005), como los implicados en la formación de la memoria episódica. La memoria episódica permite evocar recuerdos en el contexto donde fueron experimentados, incluido el orden y la localización de los mismos (Tulving, 2002). Se cree que el hipocampo participa en esta modalidad de memoria mediante la unión de los estímulos con su marco espacio-temporal (Eichenbaum, 2004). Así, el ritmo theta hipocámpico puede establecer un marco temporal para la integración de la actividad neuronal, generando asociaciones temporales entre los eventos y la oscilación (Buzsáki, 2006).

En este sentido, podemos determinar una tercera función para la oscilación theta y es la del control de la potenciación a largo plazo (LTP, *Long Term Potentiation*), lo que conduce a una

regulación temporal del almacenamiento y recuperación de información desde el hipocampo. Numerosos estudios han mostrado que la estimulación eléctrica de las fibras aferentes del hipocampo es una forma efectiva de inducción de LTP (Bliss y Lomo, 1973; Douglas y Goddard, 1975; Huang et al., 2012; Scott et al., 2012). Así, la llegada de estímulos en diferentes fases del ciclo theta es capaz de producir efectos de naturaleza variable en el proceso de LTP (Pavlidis et al., 1988; Huerta y Lisman, 1995; Hölscher et al., 1997; Hyman et al., 2003). Si la entrada de información se produce en la fase positiva de la onda theta, se produce potenciación, mientras que si lo hace en la fase negativa se produce una depresión de este proceso. Bajo este paradigma, Hasselmo (2005) propuso un funcionamiento diferencial de la oscilación theta dependiente de fase. Así, el pico del ciclo theta, registrado en CA1, es el periodo de codificación de información entrante en hipocampo desde corteza entorrinal, mientras que el valle de la oscilación representa la recuperación de información en sentido opuesto.

Finalmente, no se puede explicar el ritmo theta sin mencionar el sueño. En mamíferos podemos categorizar el sueño como la transición entre dos estados cíclicamente alternos: el sueño de ondas lentas (*slow-wave sleep*, SWS), o sueño no-REM, y el sueño paradójico (*rapid-eye-movement*, REM). El SWS se caracteriza por la disminución de los niveles de acetilcolina y la presencia de oscilaciones lentas (por debajo de 3 Hz) en el electroencefalograma. Por su parte, el sueño REM presenta un incremento de los niveles de acetilcolina acompañado por la presencia de ritmicidad theta en el electroencefalograma (Jouvet, 1969). Diversos estudios han demostrado la importancia del sueño en la consolidación de la memoria, haciendo especial hincapié en la fase REM, la cual parece tener un papel esencial en este proceso (para revisión, Rasch y Born 2013, figura 3). Durante la fase REM, el hipocampo muestra sincronización a frecuencia theta con la corteza prefrontal medial (Benchenane et al., 2010). Este acoplamiento no se produce únicamente entre la actividad global de las áreas registradas, sino que también se da entre la actividad unitaria y la oscilación theta. De hecho, las *place cells* de hipocampo muestran el mismo acoplamiento de fase al theta hipocámpico durante la actividad exploratoria y en la fase REM del sueño, exhibiendo el mismo patrón de activación temporal que mostraron durante la vigilia activa (O'Neill et al., 2010). Este suceso se ha observado también entre la actividad neuronal de corteza prefrontal y el ritmo theta de hipocampo (Benchenane et al., 2010) y se postula que podría darse en toda la red de representación espacial hipocámpica y extrahipocámpica (Hasselmo, 2008).

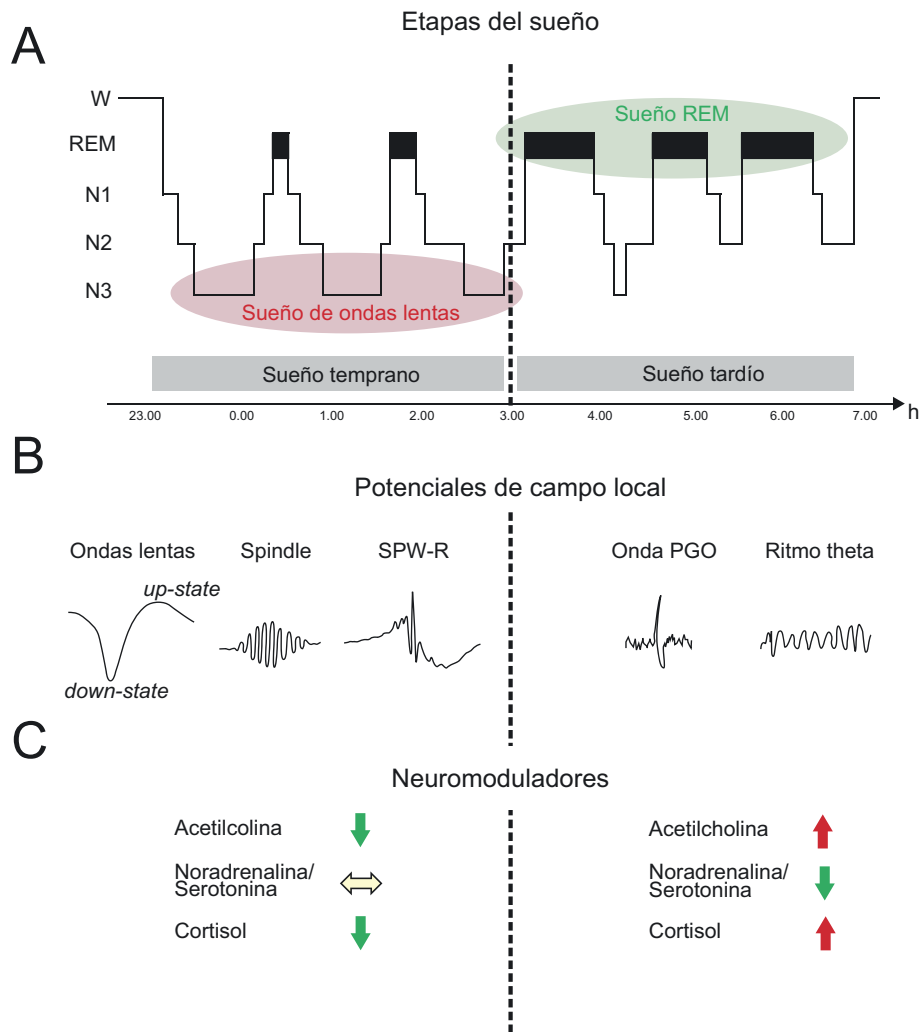


Figura 3: Perfil típico de sueño en humanos. **A.** El sueño se caracteriza por la sucesión cíclica de periodos de sueño paradójico, o REM, y de sueño de ondas lentas, o sueño no-REM. El sueño no-REM incluye mayoritariamente al sueño de ondas lentas, correspondiente a N3, y periodos de sueño mas ligeros N1 y N2. Durante el sueño paradójico, la proporción de fases varía drásticamente, mostrando una predominancia de las fases REM. (W: estado de vigilia). **B.** Durante el sueño no-REM, las oscilaciones típicas registradas suelen ser ondas lentas neocorticales (de unos 0.8 Hz), *spindles* talamocorticales (husos cortos intercalados en las ondas lentas de entre 10 y 15 Hz) y las *sharp-wave ripples* (SPW-R; ondas de despolarización rápida generadas en la CA3 de hipocampo, superpuestas con *ripples* de alta frecuencia de entre 100 y 300 Hz). Por su parte, el sueño REM se caracteriza por oscilaciones ponto-genículo-occipitales (PGO) y actividad theta hipocámpica. **C.** El sueño presenta un cambio drástico en la neuroquímica cerebral. Durante el sueño de ondas lentas, la actividad colinérgica alcanza un mínimo, mientras que en la fase REM estos niveles son similares, o incluso mas altos, que durante el estado de vigilia. Un patrón similar se observa con el cortisol, la hormona del estrés. Sin embargo, la actividad aminérgica, elevada durante la vigilia, ve su cantidad disminuída progresivamente durante el sueño de ondas lentas, hasta el sueño REM, donde presenta un mínimo absoluto. Modificado de Rasch (2013).

1.2.2 *Generación de la oscilación theta hipocámpica*

El sistema límbico representa varios sistemas de sincronización neuronal (Bland y Colom, 1993) siendo la ritmicidad theta uno de los patrones más prominentes. En el hipocampo, esta actividad sincrónica implica a poblaciones de neuronas que muestran oscilaciones en sus potenciales de membrana, resultado de las propiedades intrínsecas de sus células. Sin embargo, esta actividad local está influida por aportaciones de neuronas del propio hipocampo, así como de sus aferencias.

Los microcircuitos corticales, incluyendo las diferentes áreas del hipocampo, parecen seguir un principio de organización estereotipado, según el cual la mayoría de sus neuronas son una población relativamente homogénea de células excitatorias, mientras que el resto forma un conjunto diverso de interneuronas inhibitorias de naturaleza GABAérgica (Somogyi et al., 1998). Si bien el almacenaje de información parece residir en las conexiones sinápticas entre neuronas excitadoras, la población de interneuronas corticales juega un papel crucial en el control de la precisión temporal del trasiego de información dentro de las oscilaciones de la red cortical (Manns et al., 2007). Este modelo implica la necesidad de osciladores que marquen patrones temporales precisos dentro del propio ritmo dominante. En estos mecanismos de control parecen jugar un papel muy importante diversas áreas subcorticales. El hipocampo es el sustrato anatómico en el que la oscilación theta se evidencia durante los momentos de activación, siendo no sólo el generador de dicha actividad, sino que también actúa como el acoplador de los diversos osciladores del circuito theta (Lubenov y Siapas, 2009). En esta sección se describirá en detalle la ritmicidad theta de hipocampo y la modulación de la misma a través de una red subcortical.

1.2.2.1 *Dos tipos de ritmicidad theta en hipocampo*

Dejando a un lado los correlatos funcionales, en animales con libre movilidad se han registrado dos componentes de ritmicidad theta en función de su respuesta farmacológica. Uno de los componentes theta se ve modulado por fármacos que actúan sobre el sistema colinérgico, como el agonista carbacol o los antagonistas atropina y escopolamina. Este componente de theta fue denominado por Vanderwolf y su equipo como theta atropina resistente o theta atencional (Kramis et al., 1975). Este tipo de actividad theta se puede reproducir mediante la activación de determinadas estructuras de la formación reticular troncoencefálica (Green y Arduini, 1954) o por estimulación sensorial (Sainsbury et al., 1987). El otro componente de la actividad theta está correlacionado con el movimiento translacional y no se ve afec-

tado por fármacos colinérgicos, por lo que recibió el nombre de theta de movimiento o atropina-resistente.

RITMICIDAD THETA ASOCIADA AL MOVIMIENTO Tal y como se ha explicado, durante el movimiento se puede registrar una componente theta asociada en el hipocampo. No obstante, cabe plantearse la duda de a qué aspecto del movimiento puede hacer referencia esta actividad. Teniendo en cuenta que el ritmo theta se ha registrado en hipocampo durante actividades como caminar, correr, nadar o saltar, es lógico pensar que el factor común relacionado con la actividad oscilatoria theta sea la translación a través del espacio. De hecho, los pequeños movimientos de cabeza durante el olfateo exploratorio, o *sniffing*, van acompañados de esta componente theta, por lo que parece que este theta está ligado a la translación de la cabeza por el espacio o, específicamente, la generación de impulsos motores que desencadenarían un cambio en la posición relativa de la cabeza en el espacio. Además, los cambios en la frecuencia de la actividad de theta se correlacionan con la velocidad de movimiento del animal a través del entorno (Rivas et al., 1996; Sławińska y Kasicki, 1998) o la rapidez de iniciación del movimiento (Whishaw y Vanderwolf, 1973).

RITMICIDAD THETA ASOCIADA A ESTADOS ATENCIONALES La componente theta atencional parece correlacionarse con estados psicológicos tales como la excitación o la atención. Rara vez ocurre aisladamente en ratas, pero es mucho más común en conejos, cobayas y gatos. En las ratas, ocurre naturalmente durante los estados de inmovilidad relacionados con el miedo, comportamiento de *freezing*, ante estímulos nocivos, estímulos aversivos condicionados o cuando el animal se encuentra inmóvil pero preparándose para ejecutar un movimiento. Sainsbury et al. (1987) demostraron que la capacidad de un estímulo para generar este tipo de theta atencional depende del nivel previo de excitación del animal. Un estímulo relativamente neutro, como un tono, que normalmente no suele evocar actividad theta, puede provocar una respuesta atencional theta exagerada en un animal previamente sensibilizado con un estímulo relevante para la supervivencia. Se planteó así la posibilidad de que el theta atencional represente una activación sub-umbral del sistema motor. Sinnamon et al. (2000) registraron la actividad theta en ratas anestesiadas con uretano antes, durante y tras movimientos escalonados de las extremidades posteriores, provocados mediante la estimulación eléctrica del hipotálamo o mediante bloqueo farmacológico del núcleo dorsal del rafe. Ambas manipulaciones permitieron registrar actividad theta de baja frecuencia, presumi-

blemente relacionada con el theta atencional, así como oscilaciones theta de alta frecuencia, compatible con el theta translacional, siempre en presencia de los movimientos de las extremidades. Estos resultados sugieren que la actividad theta atencional puede reflejar el procesamiento de la programación de movimientos en ausencia del movimiento en sí mismo.

1.2.2.2 *El ritmo theta en la formación hipocámpica*

El ritmo theta no es un proceso global homogéneo en la formación hipocámpica, ya que se han observado variaciones de fase y amplitud en diferentes áreas. Mientras que las ondas theta de gran amplitud se encuentran presentes en el giro dentado y en CA1 del hipocampo, CA3 no presenta esta actividad, si bien es verdad que sus neuronas están acopladas en fase con el theta registrado en otras áreas. Así, la presencia o ausencia de actividad theta no es únicamente dependiente de la actividad de un único tipo neuronal. La presencia de theta depende, al menos en parte, de la relación conjunta de un complejo sistema anatómico neuronal y de las relaciones de fase establecidas entre su actividad (Andersen et al., 2007).

La formación hipocámpica es un grupo de áreas compuesto por el giro dentado, el asta de Amón subdividida en las regiones CA1, CA2 y CA3 (CA: *Cornu Ammonis*), el complejo subicular y la corteza entorrinal. El hipocampo se organiza siguiendo el patrón de una allocorteza, con tres capas celulares bien delimitadas, aunque su interconectividad es muy diferente a las estructuras isocorticales (Felleman y Van Essen, 1991). Tal y como describió Santiago Ramón y Cajal (1893), el hipocampo muestra rutas unidireccionales como patrón conectivo predominante (figura 4 A). De forma simplificada, la información entrante en la formación hipocámpica encontraría su ruta a través de la corteza entorrinal. Las células en las capas superficiales de la corteza entorrinal envían axones que proyectan al giro dentado mediante la denominada *ruta perforante*. El giro dentado no envía proyecciones recíprocas sobre el córtex entorrinal por lo que la vía perforante es unidireccional. Las células granulares del giro dentado, a su vez, generan axones, organizados en las llamadas *fibras musgosas*, que proyectan sobre las células piramidales de CA3. Esta ruta también es unidireccional, ya que CA3 no proyecta de vuelta al giro dentado. Las neuronas piramidales de CA3 representan la mayor eferencia a CA1 mediante sus proyecciones (*colaterales de Schaffer*) hacia las neuronas piramidales de dicha capa. Al igual que en los casos anteriores, CA1 no proyecta de vuelta a CA3. Por su parte, CA1 proyecta de forma unidireccional hacia el subiculum y, desde ahí, de nuevo hacia la corteza entorrinal.

El patrón de conexiones de hipocampo es ligeramente más elaborado, pero de forma general, esta unidireccionalidad explica adecuadamente su funcionalidad. CA1 también proyecta hacia la corteza entorrinal. Además, el subiculum no sólo proyecta sobre el presubiculum y el parasubiculum sino que también envía axones al córtex entorrinal. Mediante estas conexiones, el subiculum y CA1 cierran el bucle de procesamiento hipocámpico que empieza en las capas superficiales de la corteza entorrinal y acaban en las capas profundas de la misma (Andersen et al., 2007). Un resumen de la organización de este circuito trisináptico puede observarse en la figura 4 B.

Los estudios en el hipocampo de la rata han permitido observar las corrientes sinápticas implicadas en la generación de la oscilación theta. Las capas 2 y 3 de la corteza entorrinal envían fuertes *inputs* activadores a través de la ruta perforante (Witter, 1993), generando la aparición de una marcada oscilación theta en la capa molecular del giro dentado, con la actividad unitaria acoplada de las neuronas granulares (Muñoz et al., 1990) y de las interneuronas (Sik et al., 1997). Los experimentos de registro llevados a cabo por Kamondi (1998) sobre las neuronas piramidales de CA1, demostraron que estas células actúan como dipolos, con potentes fuentes generadoras de corriente en las dendritas apicales situadas en el *stratum oriens* (SO) y sumideros en los terminales axónicos del *stratum lacunosum moleculare* (SLM). La máxima amplitud del ritmo theta registrado en estas neuronas se produce en el SO, lugar al que llegan las proyecciones de la capa 3 de la corteza entorrinal y del núcleo *reuniens* del tálamo (Buzsáki, 2006). Por su parte las *grid cells* de la capa 2 del córtex entorrinal proyectan sobre las neuronas piramidales de CA3 y las células granulares del giro dentado (Moser et al., 2008).

La entrada a través de la corteza entorrinal supone la mayor aferencia generadora de actividad theta en hipocampo, sin embargo, su eliminación quirúrgica no elimina completamente el theta registrado en CA1 (Bragin et al., 1995). El ritmo theta registrado en CA1, remanente tras la ablación de la corteza entorrinal, es altamente coherente con el originado en CA3. De hecho, ambas oscilaciones presentan un acoplamiento en la misma fase (Buzsáki, 2002). Sin embargo, el theta registrado en CA3 y el debido a la entrada a través de corteza entorrinal se encuentran en antifase (Brankačk et al., 1993). Además, también existe una población de interneuronas que inhibe periódicamente al soma de las piramidales de CA1, mediante una actividad a ráfagas acoplada al theta registrado en dicha capa. Esta inhibición permitiría controlar de forma más precisa el patrón de activación de las neuronas piramidales de CA1 respecto de la oscilación theta (Skaggs et al., 1996; Csicsvari et al., 1999; Buzsáki, 2006). Todo

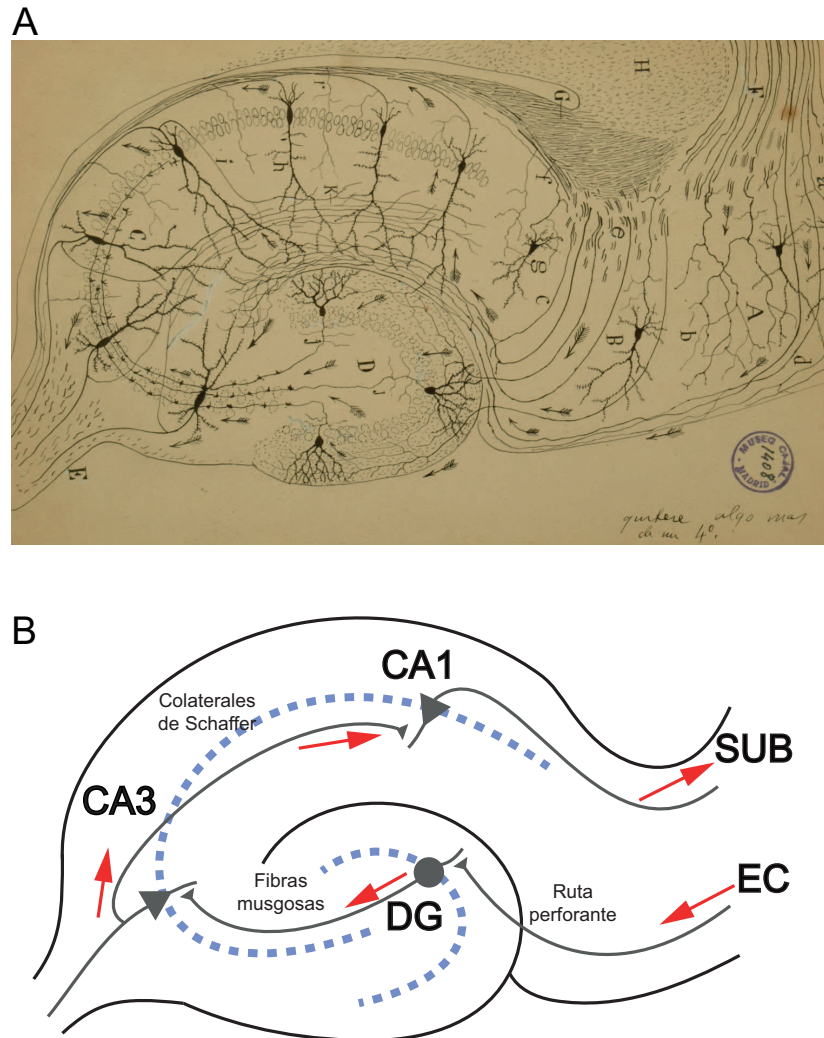


Figura 4: Circuito trisináptico hipocámpico. **A.** Representación del circuito hipocámpico dibujada por Santiago Ramón y Cajal (Litografía del Instituto Cajal, CSIC). **B.** Esquema del circuito trisináptico: La información proveniente del córtex entorrinal (EC) viaja a través de la vía perforante hasta el DG, el cual proyecta mediante las fibras musgosas a las neuronas piramidales de CA3. Éstas, mediante las colaterales de Schaffer, proyectan sobre CA1, la cual envía la información a subículo (SUB).

esto apunta a la presencia de un sistema de generación y mantenimiento de la ritmicidad theta, independiente de la corteza entorrinal.

Desde los inicios del estudio de la actividad theta hipocámpica se planteó encontrar un sistema de control de la ritmicidad de dicha oscilación. La búsqueda de este marcapasos dio lugar a resultados prometedores en el sistema colinérgico del complejo del septum medial/banda diagonal de Broca (MS/DB), impulsado por el complejo reticular oral del puente (RPO) en el tronco del encéfalo (Petsche et al., 1965). El área septal proporciona una entrada colinérgica, glutamatérgica y GABAérgica al hipocampo. Mientras que las neuronas colinérgicas inervan tanto a células principales como a interneuronas, las neuronas de proyección GABAérgicas del septum medial sinaptan sobre las interneuronas de hipocampo, incluidas las *basket cells* parvalbúmina positivas (Freund y Antal, 1988). Investigaciones mas recientes revelaron que las interneuronas del hipocampo, con proyecciones de largo alcance, inervan a las células de proyección del complejo septal. Además, el núcleo supramamilar del hipotálamo, densamente conectado con el septum medial, también participa en el sistema de marcapasos theta y de su modulación (Vertes y Kocsis, 1997).

Las contribuciones del MS/DB, así como de la corteza entorrinal, al patrón theta hipocámpico, han sido descritas mediante una combinación de lesiones y manipulaciones farmacológicas (Bland y Oddie, 2001; Buzsáki, 2002). Las lesiones del MS/DB eliminan ambos tipos de theta registrado en hipocampo. La inyección de fármacos en el septum revela diferencias en la base farmacológica de ambos tipos de theta (Lawson y Bland, 1993). La inactivación mediante inyección intraseptal del anestésico local procaína, o del agonista GABAérgico muscimol, elimina ambas componentes sensible y resistente de actividad theta (Winson y Abzug, 1978; Bland et al., 1996; Koenig et al., 2011). Sin embargo, la inyección en septum de antagonistas colinérgicos, como la atropina, es capaz de bloquear el theta si el animal se encuentra en reposo o quietud, pero deja intacto el theta relacionado con el movimiento (Kramis et al., 1975). Contrariamente, las inyecciones intraseptales de agonistas colinérgicos, como el carbacol, producen un estado de theta mantenido en el hipocampo, independiente del estado de activación del animal. Por su parte, la lesión de la corteza entorrinal elimina el theta relacionado con el movimiento, dejando intacto el theta atencional (Kramis et al., 1975). Debido a que la ketamina, antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), es capaz de eliminar el componente del theta translacional, es probable que las aferencias glutamatérgicas desde la corteza entorrinal hasta las dendritas distales

de CA1 y CA3 sean las responsables de este subcomponente de la ritmicidad theta (Buzsáki, 2002). La explicación mas plausible de estos hallazgos es que el theta relacionado con el movimiento, originado en la corteza entorrinal, requiera de la integridad de la proyección colinérgica directa desde el área septal hasta el hipocampo, quizás mediante la activación de redes de interneuronas inhibitorias.

El hecho de que los ritmos theta sobrevivan después del bloqueo de las entradas muscarínicas colinérgicas procedentes del área septal, mediante el empleo de atropina, puso de manifiesto la existencia de una fuente adicional no colinérgica de actividad theta en la corteza entorrinal (Buzsáki et al., 1983). De hecho, se encontró un dipolo de actividad theta en la corteza entorrinal con dos máximos de amplitud: uno superficial en las capas 1-2 y el otro en la capa 3 (Mitchell y Ranck, 1980; Alonso y García-Austt, 1987a,b). Estos resultados llevaron a sugerir que la visión clásica del marcapasos septal que modulaba rítmicamente a las células piramidales de hipocampo, dentro de la banda de frecuencias theta, era demasiado simplista.

Muchas investigaciones analizaron las características de los dos tipos de theta. Las entradas colinérgicas al hipocampo pueden causar la excitación de interneuronas responsables de las descargas rítmicas theta del hipocampo (Freund y Antal, 1988; Montgomery et al., 2009). Estas interneuronas, mediante su actividad en banda theta, pueden provocar potenciales sinápticos inhibitorios rítmicos en las neuronas piramidales diana. En consecuencia, las corrientes somáticas hacia el exterior en la capa piramidal CA1, pueden contribuir al campo extracelular theta (Buzsáki et al., 1983; Leung y Yu, 1998). Los agonistas colinérgicos adicionales aplicados en *slices* de hipocampo, provocan despolarizaciones rítmicas de las interneuronas del SLM a frecuencia theta, que son bloqueadas por la atropina. Esto indica que la inducción muscarínica de las oscilaciones del potencial de membrana, a la frecuencia theta, en las interneuronas de la capa SLM puede contribuir a la generación de la inhibición rítmica que impulsa la actividad theta intrínseca de las neuronas piramidales de CA1.

1.2.3 *Modulación extrahipocámpica de la actividad theta*

Si bien la formación hipocámpica es el centro de la mayoría de estudios concernientes a la actividad theta, este patrón oscilatorio es posible por la activación conjunta de una red de estructuras subcorticales capaces de iniciar y mantener dicha actividad en hipocampo.

1.2.3.1 *Control septal de la actividad theta*

Como se ha comentado anteriormente, la inhibición del septum medial, mediante lidocaína (Winson y Abzug, 1978; Koenig et al., 2011) o muscimol (Bland et al., 1996), produce la completa eliminación del ritmo theta. Sin embargo, mientras que la inyección de atropina elimina el theta atencional, deja intacto el relacionado con el movimiento (Kramis et al., 1975). Así pues, el septum medial se presenta como una parte indispensable de la generación y modulación subcortical de la ritmicidad theta (Lawson y Bland, 1993; Vertes y Kocsis, 1997). Para sincronizar la red a frecuencias theta es necesario que el hipocampo salga de su estado en reposo de ondas lentas (Csicsvari et al., 2000). Esta transición a ondas theta está desencadenada y mantenida por la acción de tipo marcapasos del septum medial sobre hipocampo (Petsche y Stumpf, 1962) a través de las proyecciones septales sobre el hipocampo (Crutcher et al., 1981).

El septum medial presenta una ecléctica población de neuronas GABAérgicas (Kiss et al., 1990; Hangya y Borhegyi, 2009), colinérgicas (Mesulam et al., 1983; Colgin, 2013) y glutamatérgicas (Manns et al., 2001; Colom et al., 2005). Las neuronas GABAérgicas se encuentran situadas en la porción medial del septum, rodeadas por las neuronas colinérgicas situadas en las capas más externas. Las neuronas colinérgicas, la mayor población de células de proyección septales, presentan dos subdivisiones según su expresión de colinacetiltransferasa. Las neuronas GABAérgicas también presentan una subdivisión en función de la expresión de parvalbúmina, siendo las parvalbúmina positivas las neuronas de proyección a hipocampo (Borhegyi et al., 2004). Las zonas externas y caudales de septum medial, tales como la banda diagonal de Broca, contienen una población de neuronas glutamatérgicas, las cuales inervan a las neuronas colinérgicas y GABAérgicas de la porción medial (Hajszan et al., 2004; Manseau et al., 2005; Colom et al., 2005).

El control del hipocampo se realiza, principalmente, mediante las proyecciones colinérgicas y GABAérgicas de septum. Las neuronas GABAérgicas parvalbúmina positivas de septum medial proyectan sobre las interneuronas de hipocampo, contribuyendo a los cambios en la inhibición somato-dendrítica de las neuronas piramidales de CA1 (Borhegyi et al., 2004). Por su parte, las neuronas colinérgicas proyectan difusamente hacia las interneuronas y las neuronas piramidales de hipocampo. Bajo la influencia de activación troncoencefálica se produce la excitación de las células colinérgicas y GABAérgicas septales (Leranth y Kiss, 1996; Vertes y Kocsis, 1997; Borhegyi et al., 1998). Las neuronas colinérgicas de MS/DB activan las células glutamatérgicas del propio septum medial (Colom et al., 2006). Además, estas

neuronas excitan a la población de células GABAérgicas septales, tanto interneuronas como neuronas de proyección. Por su parte, las interneuronas se encargan de mantener la oscilación theta endógena septal (Hajszan et al., 2004) mientras que las GABAérgicas de proyección inhiben a las interneuronas GABAérgicas de hipocampo, facilitando la despolarización de las neuronas piramidales de CA1 y, por tanto, la aparición y mantenimiento de la oscilación theta hipocámpica (Konopacki et al., 1992; Bland et al., 1999; Colom et al., 2006). Alrededor del 75 % de las neuronas de septum medial muestran actividad acoplada a hipocampo durante los procesos en los que aparece ritmicidad theta (Hangya y Borhegyi, 2009). Especialmente, las neuronas GABAérgicas de proyección sobre hipocampo muestran una actividad a ráfagas altamente acoplada al ritmo theta hipocámpico. Así pues, se ha postulado que la actividad moduladora, o marcapasos, de septum medial sobre la oscilación theta se llevaría a cabo mediante la sincronización inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas de hipocampo (Viana Di Prisco et al., 2002; Hangya y Borhegyi, 2009).

1.2.3.2 *Influencia hipotalámica en la oscilación theta*

Clásicamente, se ha considerado que el ritmo theta puede evocarse a partir de la activación de núcleos troncoencefálicos capaces de modular al hipocampo mediante proyecciones septales (Bland y Colom, 1993; Vertes y Kocsis, 1997; Bland y Oddie, 1998). En el hipotálamo, un grupo de núcleos neuronales presentan actividad acoplada a la oscilación theta de hipocampo.

El núcleo supramamilar recibe proyecciones colinérgicas directas del núcleo laterodorsal tegmental y proyecciones serotoninérgicas (5-HT) del núcleo del rafe mediano (Gonzalo-Ruiz et al., 1999). Las neuronas glutamatérgicas del núcleo supramamilar proyectan sobre el complejo septal, el giro dentado y las neuronas piramidales de CA3 (Borhegyi et al., 1998; Vertes, 1992; Pan y McNaughton, 2004). Estas neuronas muestran una actividad de disparo rítmica altamente acoplada a la oscilación theta hipocámpica (Kirk y McNaughton, 1991; Kocsis y Vertes, 1994; Kirk et al., 1996). En animales anestesiados con uretano, la inactivación con procaína del núcleo supramamilar produce una disminución de la potencia y la frecuencia del ritmo theta observado en hipocampo tras la estimulación eléctrica de los núcleos del tronco del encéfalo. Ya que la lesión de septum medial únicamente disminuye la potencia de la oscilación theta registrada en hipocampo, se ha pensado que el núcleo supramamilar tiene un papel en el control de la frecuencia de la oscilación theta (Kirk y McNaughton, 1993).

De forma paralela a lo visto en el núcleo supramamilar, la inactivación del núcleo posterior hipotalámico perjudica a la actividad theta hipocámpica en ratas y gatos anestesiados con uretano (McNaughton et al., 1995; Bocian y Konopacki, 2004). Este núcleo diencefálico presenta conexiones recíprocas con áreas troncoencefálicas implicadas en la modulación theta (Steininger et al., 1992), así como con supramamilar y el complejo septal (Vertes et al., 1995). La actividad neuronal del núcleo posterior hipotalámico acoplada al theta (Bland et al., 1995) hace pensar que, al igual que el núcleo supramamilar, pueda tener un papel modulador de la frecuencia del theta (Bocian y Konopacki, 2007).

1.2.3.3 Control troncoencefálico de la actividad theta

A mediados del siglo XX, Green y Arduini (1954) demostraron que la estimulación sensorial era capaz de generar ritmicidad theta en hipocampo. Más sorprendente fue el hallazgo de que la estimulación eléctrica de una parte de la formación reticular también era capaz de generar la aparición de esta oscilación. Posteriormente se vio que el tronco del encéfalo era capaz de modular la actividad septal y, de esta manera, modular la actividad theta hipocámpica. Se postuló que el patrón de descarga neuronal de ciertos núcleos troncoencefálicos podía ser transmitido a través del septum hasta las neuronas piramidales de hipocampo (Petsche et al., 1965). Diversos núcleos de la formación reticular pueden producir un incremento, o una disminución, de la sincronización de los diferentes osciladores theta (Vertes y Kocsis, 1997).

De entre las estructuras del tronco del encéfalo, el núcleo reticular pontino oral (*reticularis pontis oralis*, RPO), ha sido una de las dianas troncoencefálicas en el estudio de la modulación de la actividad theta hipocámpica. Se ha demostrado que RPO es el núcleo más eficaz para generar actividad theta hipocámpica en ratas anestesiadas, mediante estimulación eléctrica o colinérgica (Núñez et al., 1991; Vertes et al., 1993). Además, la inhibición de RPO elimina tanto el ritmo theta espontáneo, como el derivado de la estimulación sensorial (Bland y Oddie, 1998). Neuroquímicamente, en RPO se han descrito células GABAérgicas, serotoninérgicas y catecolaminérgicas (Jones, 1991; Reinoso-Suárez et al., 2001), con actividad tónica durante los periodos theta (Vertes, 1979). RPO recibe proyecciones colinérgicas, glutamatérgicas y aminérgicas de núcleos troncoencefálicos implicados en el control del ciclo de sueño y vigilia, siendo una eferencia principal de las neuronas colinérgicas del núcleo del tegmento pedunculopontino (Semba y Fibiger, 1992; Rodrigo-Angulo et al., 2000). En cuanto a su patrón de proyecciones, RPO inerva densamente

núcleos implicados en la red theta como el núcleo supramamilar o el núcleo del rafe mediano (Vertes et al., 1986; Bland y Oddie, 2001), si bien una de las proyecciones más notables la realiza sobre las neuronas del núcleo incertus que, a su vez, proyectan sobre el MS/DB. Es en esta marcada proyección hacia el NI donde se ha propuesto pueda residir el efecto activador de RPO sobre el hipocampo (Teruel-Martí et al., 2008).

También ejercen un papel activador de la oscilación theta los núcleos colinérgicos del tegmento pedunculopontino (PPT) y laterodorsal tegmental (LDT). Estos núcleos presentan una amplia población de neuronas glutamatérgicas, colinérgicas y GABAérgicas (Lee et al., 1988), con proyecciones colinérgicas sobre otras áreas de control de la actividad theta como el núcleo reticular pontino oral (Rye et al., 1988; Semba et al., 1990) o el septum medial (Woolf et al., 1986; Hallanger y Wainer, 1988; Vertes y Kocsis, 1997; Takano y Hanada, 2009). Se ha visto que las neuronas de estos núcleos disparan de forma tónica durante los estados de actividad con presencia de ritmo theta (Steriade et al., 1990). Adicionalmente, la estimulación eléctrica o colinérgica de los núcleos tegmentales produce la aparición de ritmicidad theta en el hipocampo, mientras que su inhibición farmacológica elimina dicha actividad (Nowacka et al., 2002). Se postula que estos núcleos mantendrían la oscilación theta, una vez ya consolidada en el hipocampo (Takano y Hanada, 2009), presumiblemente a través de la influencia colinérgica directa sobre RPO (Vertes y Kocsis, 1997).

Con un efecto opuesto, inhibitorio sobre la ritmicidad theta, se encuentran algunos núcleos troncoencefálicos serotoninérgicos. Los núcleos del rafe dorsal y medial son capaces de producir la desincronización de la actividad theta hipocámpica (Assaf y Miller, 1978), a través de la desregulación de las neuronas de hipocampo (Jackson et al., 2008), mediante sus proyecciones inhibitorias sobre el núcleo supramamilar y el MS/DB (Vertes et al., 1999). Se ha visto que tanto la inhibición como la lesión del núcleo del rafe medial origina la aparición espontánea de actividad theta hipocámpica (Kinney et al., 1995). Se ha descrito que los núcleos del rafe están densamente interconectados con estructuras de la red theta, como el hipocampo, el área septal, los núcleos colinérgicos tegmentales, el núcleo supramamilar, RPO o el núcleo incertus (Vertes, 1991; Teruel-Martí et al., 2008).

1.2.3.4 Otras estructuras relacionadas con la oscilación theta

Además de las estructuras descritas, se ha registrado actividad asociada al theta en numerosas áreas cerebrales. Una de las principales dianas de las neuronas piramidales de la CA1 de hipocampo ventral es la corteza prefrontal medial (Swanson, 1981;

Colgin, 2011), la cual recibe proyecciones excitatorias sobre células piramidales e interneuronas (Thierry et al., 2000), así como proyecciones de otras estructuras de la red moduladora theta como los núcleos tegmentales o el área septal (Condé et al., 1990, 1995; Vertes, 2002; Gabbott et al., 2005). Debido a su patrón de conexiones, no es sorprendente encontrar ritmicidad theta en los registros de potencial de campo de corteza prefrontal medial. De hecho, las células piramidales y las neuronas parvoalbúmina positivas de esta corteza se encuentran acopladas en fase con la oscilación theta hipocámpica (Battaglia et al., 2011). Se ha visto que durante procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria, aumenta la sincronización y el acoplamiento entre hipocampo y corteza prefrontal (Benchenane et al., 2011; Colgin, 2011; Takehara-Nishiuchi et al., 2012).

Otra de las regiones ligadas a la actividad theta es la amígdala, esencial para la generación de respuestas emocionales y comportamentales a estímulos biológicos relevantes. El complejo amigdalino representa el nexo de unión entre la entrada de información sensorial y las respuestas mediadas por el sistema límbico, el hipotálamo o los núcleos troncoencefálicos (McDonald, 1998; Swanson y Petrovich, 1998). La amígdala recibe proyecciones de varios nodos de la red theta, tales como el hipocampo ventral, el complejo del septum medial/banda diagonal de Broca o los núcleos talámicos (Canteras y Swanson, 1992; McDonald y Mascagni, 1997; Kishi et al., 2006), por lo que es lógico pensar en una posible participación activa de dicha red. Además, presenta un patrón de proyecciones sobre numerosos núcleos relacionados con el ritmo theta (Petrovich et al., 1996; Canteras y Swanson, 1992; McKenna y Vertes, 2004). Los estudios de Paré (1996) demostraron la existencia de neuronas en la amígdala basolateral acopladas a la ritmicidad theta de hipocampo. Se ha observado que la CA1 de hipocampo y la amígdala incrementan su sincronización durante el miedo condicionado (Seidenbecher et al., 2003) y, sin embargo, la disminuyen con los procesos de extinción (Lesting et al., 2011). Por todo ello, se postula que el sistema amigdal-hipocámpico, a través de la sincronización a frecuencias theta, podría favorecer el establecimiento de ventanas temporales que facilitaran la interacción sináptica del sistema límbico (Paré y Gaudreau, 1996).

1.3 EL NÚCLEO INCERTUS

El núcleo incertus (NI) es un núcleo del tegmento pontino situado en el suelo del cuarto ventrículo con gran conectividad con la red neuronal generadora de actividad theta (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Cervera-Ferri et al., 2012).

Nuestro grupo ha demostrado la implicación directa de este núcleo con la oscilación theta hipocámpica (Núñez et al., 2006; Cervera-Ferri et al., 2011). En este trabajo se ahondará en la contribución de la actividad de NI a la oscilación theta.

1.3.1 Anatomía y neuroquímica

El núcleo incertus se encuentra localizado a lo largo de la línea media del puente del troncoencéfalo, caudal al núcleo dorsal del rafe y entre las porciones bilaterales del núcleo posterodorsal tegmental (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). En la rata adulta, este núcleo se encuentra situado desde 9.12 mm por detrás de Bregma y se extiende durante unos 0.7 mm en el eje rostro-caudal. Paxinos y Watson (2004) se refieren a NI como parte de la sustancia gris periacueductal, subdividiéndolo en núcleo O (CGO) y en *central gray pars alfa* (CGA). Según la nomenclatura actual el NI se divide en dos partes: *pars compacta* (NIc) y *pars dissipata* (NIId) (coincidentes con CGO y CGA). El NIc se encuentra emplazado en la línea media, dorsal al fascículo longitudinal medial, con neuronas densamente empaquetadas en dos columnas a ambos lados de la línea media. El NIId recorre lateralmente toda la longitud del NIc, ventral a los núcleos dorsal y posterodorsal tegmental, y presenta una población neuronal más dispersa (Goto et al., 2001).

Tradicionalmente se consideró a NI como parte del rafe dorsal debido a que la tinción de Giemsa plantea dificultades a la hora de delimitar estos núcleos (Hayakawa y Zyo, 1983), siendo una continuación del otro sin clara una delimitación morfológica. El estudio neuroquímico y conectivo de esta zona permitió, sin embargo, delimitar el NI y diferenciarlo claramente del rafe dorsal. Si bien el rafe dorsal es eminentemente serotoninérgico, las neuronas de NI han demostrado expresar mayoritariamente glutamato descarboxilasa (GAD), una enzima implicada en la formación del GABA, propia de las neuronas inhibitorias encefálicas. Esta población de neuronas GAD positivas ha sido descrita como neuronas GABAérgicas de proyección (Ma et al., 2007). El núcleo incertus también expresa las proteínas fijadoras de calcio calbindina (CB) y calretinina (CR). La CB está uniformemente presente por todo el NI, mientras que la CR se expresa únicamente en el NIc (Cervera-Ferri et al., 2012). Aun habiendo sido clásicamente considerado como un núcleo mayoritariamente inhibitorio, nuestro grupo pudo demostrar la presencia de neuronas glutamatérgicas de proyección hacia el complejo septal (Cervera-Ferri et al., 2012).

Además de estos dos neurotransmisores, NI expresa una diversidad de neuropéptidos que demuestra su variabilidad neu-

roquímica. Entre los más notables se encuentra la relaxina-3 (RLX₃), un neuromodulador implicado en respuestas a estrés, ciclos circadianos y memoria espacial, entre otras funciones (Smith et al., 2011). Adicionalmente, las neuronas RLX₃ positivas de NI coexpresan GABA (Ma et al., 2007). Otro péptido expresado por las neuronas de NI de roedores es la neuromedina B (NMB), una sustancia de la subfamilia de las ranatensinas, relacionada estrechamente con el mantenimiento de la homeostasis (Lein et al., 2007; Ryan et al., 2011). Este núcleo, también presenta expresión de colecistoquinina (CCK) (Kubota et al., 1983).

El NI presenta sensibilidad para neuropéptidos y transmisores de distinta naturaleza. Por una parte, las neuronas RLX₃ positivas de NI expresan receptores para serotonina-1A (5HT_{1A}). Se ha observado que la depleción de serotonina en NI produce un aumento de relaxina-3, dando a la 5HT un papel regulador de la expresión de RLX₃ en NI (Miyamoto et al., 2008). Sumado a que una de las principales proyecciones de NI es también el núcleo del rafe mediano, estos hechos parecen apuntar a un control recíproco sobre la activación hipocámpica. Por otro lado, en roedores se han descrito receptores para el factor liberador de corticotropina tipo 1 (CRH₁), receptores 5HT_{1A} y receptores metabotrópicos tipo 3 para glutamato (mGluR₃) (Ryan et al., 2011). El receptor CRH₁ se encuentra densamente presente en todo el NI de rata (Van Pett et al., 2000). Se ha propuesto un posible papel de este receptor en la relación con la modulación del estrés, u otros procesos cognitivos, ya que la infusión de CRH en NI produce la inactivación de corteza prefrontal medial (Farooq et al., 2013). Finalmente, la expresión de mGluR₃ parece estar ligada a la transmisión excitatoria sobre NI de corteza prefrontal medial y otros núcleos troncoencefálicos (Tanabe et al., 1993).

1.3.2 Conectividad del núcleo incertus

Los estudios sistemáticos de Goto (2001) y de nuestro propio grupo (Olucha-Bordonau et al., 2003) acerca de la conectividad y la organización de NI, han demostrado que este núcleo presenta un extenso patrón de conexiones que le sitúan en una posición crítica en la red troncoencefálica ascendente. En el estudio de Goto se empleó la subunidad B de la toxina colérica para realizar el marcaje retrógrado y la subunidad leucoaglutinina de la fitohemaglutinina para realizar el marcaje anterógrado. Nuestro grupo también empleó toxina colérica y *fluorogold* como marcador retrogrado pero, por contra, se empleó dextranamina biotinilada como marcador anterógrado.

Lo mas destacable de la conectividad del NI (figura 5) es sus conexiones recíprocamente con una gran multitud de áreas im-

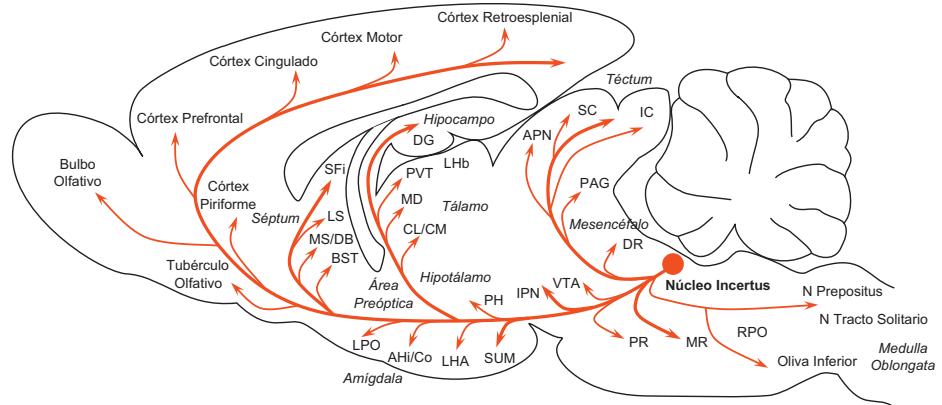


Figura 5: Esquema de proyecciones del núcleo incertus en el cerebro de ratón. AHi, área amigdalohipocámpica; APN, núcleo preteccional anterior; BST, núcleo del lecho de la *stria terminalis*; CL/CM, núcleos talámicos centrolateral/centromedial; Co, núcleo de la amígdala cortical; DB, núcleo de la banda diagonal; DG, giro dentado; DR, rafe dorsal; IC, colículo inferior; IPN, núcleos interpedunculares; LHA, área hipotalámica lateral; LHb, habénula lateral; LPO, área preóptica lateral; LS, núcleos septales laterales; MD, núcleo talámico mediodorsal; MR, rafe medial; PAG, sustancia gris periacueductal; PDTg, núcleo tegmental posterodorsal; PH, hipotálamo posterior; PR, núcleo del rafe pontino; PVT, núcleo talámico paraventricular; RPO, núcleo reticular pontino oral; SC, colículo superior; SFi, núcleo septofimbrial; SUM, núcleo supramamilar; VTA, área ventral tegmental. Modificado de Ryan (2011).

plicadas en la red de modulación de la actividad theta, como la región septal, el área hipocámpica, el núcleo supramamilar, el núcleo RPO, los núcleos del rafe, núcleos tegmentales o regiones hipotalámicas (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008). Esta circunstancia hizo pensar en el NI como un núcleo troncoencefálico implicado en la activación de la ritmicidad theta hipocámpica. A partir de esta descripción, gran parte de los trabajos posteriores se encaminaron a demostrar la influencia de NI sobre el sistema septohipocámpico.

1.3.3 Relación del núcleo incertus con la oscilación theta

Son diversos los estudios que han podido demostrar la relación de NI con el ritmo theta de hipocampo. Como se ha comentado, el NI proyecta sobre los principales núcleos implicados en la generación o modulación de la actividad theta (Vertes y Kocsis, 1997; Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008). Numerosos estudios han demostrado que el NI cumple un papel activo en la red theta hipocámpica. Se ha visto que la estimulación eléctrica de NI en ratas anestesiadas con uretano es capaz de inducir la aparición de actividad theta en hipocampo.

Es más, la lesión de NI es da lugar a la interrupción de la actividad theta hipocámpica evocada por la estimulación eléctrica de RPO (Núñez et al., 2006) (figura 7). Recientemente, se ha demostrado en ratas no anestesiadas la aparición de actividad theta ligada a la locomoción (Farooq et al., 2016) así como desincronización cortical y un estado general de *arousal* (Ma et al., 2017). Adicionalmente, se ha podido demostrar que NI parece ser el principal relevo en la ruta ascendente desde el núcleo RPO hasta el MS/DB (Teruel-Martí et al., 2008). En un trabajo de nuestro grupo se pudo ver que la activación eléctrica o colinérgica de RPO, en ratas anestesiadas, es capaz de generar la aparición de actividad theta altamente coherente tanto en el hipocampo como en el núcleo incertus. (Cervera-Ferri et al., 2011).

El análisis de la actividad neuronal del NI permitió detectar la presencia de dos grupos neuronales, caracterizados según sus propiedades electrofisiológicas. En condiciones de anestesia con uretano, se distinguieron dos tipos neuronales en el NI: las neuronas tipo I, las cuales presentaban un patrón de disparo irregular a frecuencia theta (a unos 9 Hz) y las neuronas tipo II, que poseían actividad rítmica a frecuencias rápidas (entre 13 y 25 Hz). Ambos grupos neuronales incrementaban su tasa de disparo en relación a la aparición de actividad theta en el hipocampo, tanto tras la estimulación eléctrica de RPO como tras la activación sensorial por pinzamiento de la cola del animal (Núñez et al., 2006) (figura 6), pudiéndose clasificar como neuronas *theta-on*, atendiendo a la nomenclatura empleada en otras estructuras relacionadas con la actividad theta.

No obstante, se desconoce la contribución exacta de este núcleo en la generación o modulación de la oscilación theta. El trabajo presentado trata de dar respuesta a varios interrogantes concernientes a la conectividad funcional del NI, como parte de la red generadora de actividad theta hipocámpica. En primer lugar, la actividad oscilatoria theta presente en NI y acoplada a la registrada en el hipocampo, puede deberse a que exista un trasiego de información entre ambas estructuras, en los momentos de activación del sistema. Así, se planteó la posibilidad de que existiera un flujo neto de información entre el NI y el hipocampo con un sentido preferente. En segundo lugar, ninguna de las poblaciones neuronales descrita hasta la fecha en NI permitiría afirmar que la oscilación theta registrada en su campo local fuera generada en el propio NI. Es por ello que, bajo las mismas condiciones de activación en las que se ha detectado actividad altamente acoplada entre hipocampo y NI, se analizó de nuevo la actividad unitaria en NI, con el objetivo de detectar la posible presencia de neuronas rítmicas a frecuencia theta, no observadas previamente, así como de analizar el acoplamiento

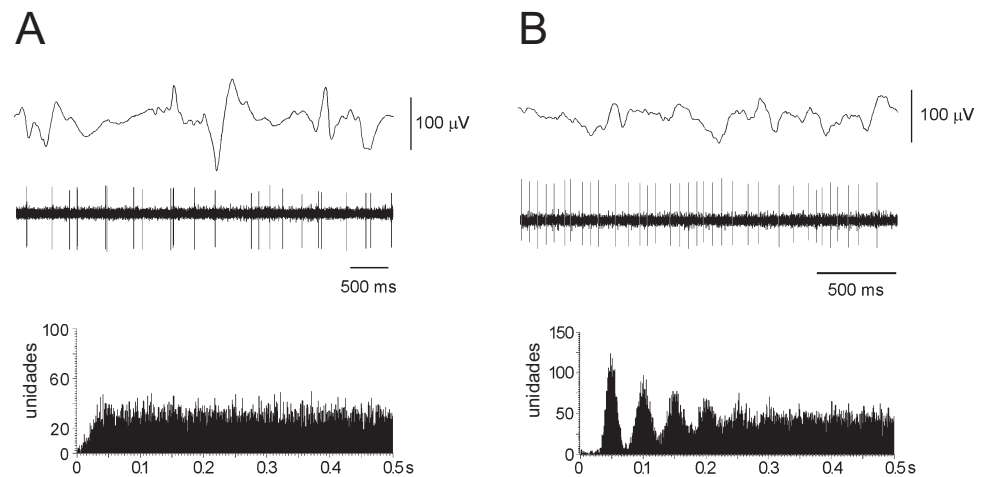


Figura 6: Patrón de disparo de las neuronas de NI. **A.** Se han descrito neuronas Tipo I, caracterizadas por un patrón de disparo no rítmico a frecuencia theta, como se observa en el registro crudo y el autocorrelograma. **B.** Las neuronas Tipo II presentan un patrón de disparo rítmico a frecuencias superiores a theta. Modificado de Nuñez *et al.* (2006).

de cada población neuronal a la oscilación hipocámpica. Este estudio se complementó con el estudio de las relaciones causales entre las distintas poblaciones neuronales encontradas en el NI y la actividad hipocámpica, a fin de refinar la comprensión de las interacciones funcionales entre el NI y el hipocampo. Por último, en base a la conexión masiva hacia el MS/DB, considerado marcapasos del theta, se exploró la posibilidad de que NI fuera capaz de reiniciar la fase de la oscilación theta del hipocampo mediante su estimulación. Este proceso facilitaría la gestión de la información mnemónica creando nuevas ventanas de procesamiento. Teniendo en cuenta la sensibilidad de NI al sistema colinérgico, y al estrés, y tratándose de un núcleo relacionado con elevados niveles de *arousal*, la capacidad de originar un reinicio de fase lo capacitaría como mediador de la adaptación de la respuesta hipocámpica para procesar de manera óptima estímulos relevantes o de elevada *saliencia*.

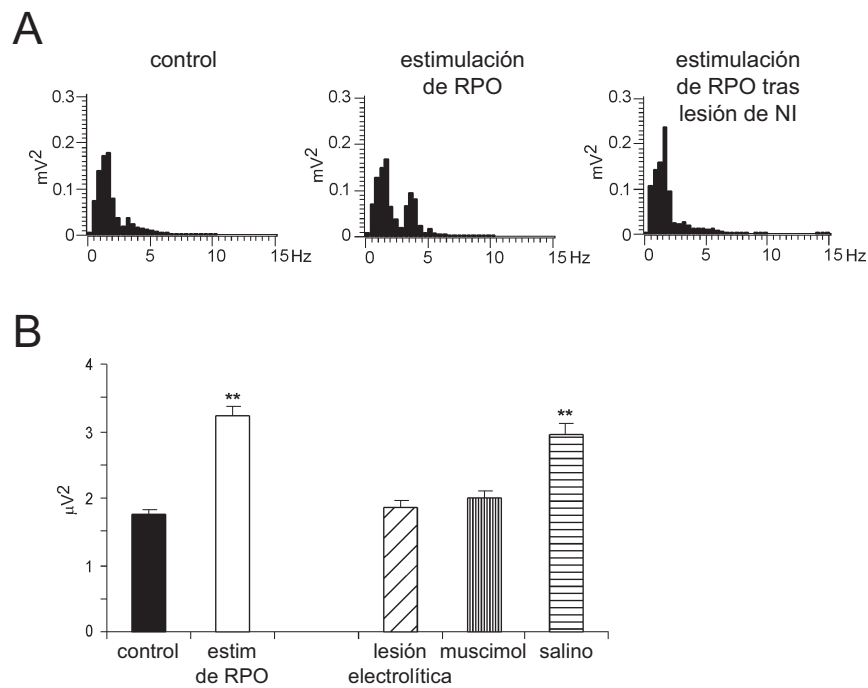


Figura 7: La lesión del núcleo incertus elimina el ritmo theta evocado por la estimulación eléctrica de RPO. **A.** Espectro de potencias de la actividad local de hipocampo. La estimulación eléctrica de RPO provoca la aparición de ritmo theta en el registro de hipocampo. Esta actividad desaparece tras la lesión de NI. **B.** Potencia hipocampo media de la banda theta. Tanto la lesión electrolítica como la inyección de muscimol en NI eliminan la actividad theta evocada por la estimulación de RPO. Modificado de Nuñez *et al.* (2006).

HIPÓTESIS

Los antecedentes presentados permiten formular la hipótesis de que *el NI constituye un elemento relevante de la red troncoencefálica implicada en la generación y control de la activación del ritmo theta hipocámpico a tenor de sus conexiones y de su contribución a un sistema de osciladores acoplados. Utilizando como modelo la actividad theta de hipocampo en ratas anestesiadas con uretano, planteamos el estudio de la actividad poblacional y unitaria de NI en momentos de ritmicidad theta hipocámpica mantenida.*

Desglosadas, las hipótesis de trabajo que hemos planteado, con sus correspondientes objetivos, han sido:

- I. *El núcleo incertus podría presentar conectividad funcional con el hipocampo en periodos de activación theta sostenida.*
 - a) *Cuantificar la coherencia y el acoplamiento entre las señales LFP de NI y de hipocampo mediante la generación de actividad theta mantenida por infusión de carbacol en RPO.*
 - b) *Analizar los patrones de causalidad presentes en condiciones basales y tras la generación de la actividad theta colinérgica.*
- II. *El núcleo incertus podría presentar una población neuronal capaz de generar actividad oscilatoria theta local.*
 - a) *Estudiar el patrón de disparo de las neuronas de NI en condiciones de aparición de ritmo theta hipocámpico.*
 - b) *Analizar si existen neuronas de NI acopladas al ritmo theta hipocámpico.*
- III. *Las distintas poblaciones neuronales de núcleo incertus podrían mantener relaciones causales específicas con la actividad theta hipocámpica*
 - a) *Determinar la direccionalidad del flujo informativo entre las diferentes poblaciones neuronales del NI y la actividad oscilatoria de hipocampo, en condiciones de actividad theta mantenida reversible.*

- IV. *Atendiendo a su conexión directa sobre el complejo septal, el núcleo incertus es capaz de reiniciar las ondas theta del hipocampo.*
- a) Comprobar la capacidad del reinicio de la fase del ritmo theta hipocámpico mediante la estimulación eléctrica del NI.*
 - b) En el caso de que el NI sea capaz de generar un reinicio de fase, comprobar si este efecto depende del complejo septal.*

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo se emplearon un total de 72 ($38 + 10 + 8 + 16$) ratas hembra adultas Sprague-Dawley (Blackthorn, Bicester, Reino Unido) de entre 200 y 350 g de peso (tabla 1). Los animales se mantuvieron estabulados con temperatura controlada (23 ± 3 °C), ciclo regular de luz-oscuridad y agua y comida *ad libitum*. Los procedimientos se llevaron a cabo bajo la regulación de la directiva Europea para la protección de animales de uso científico (2010/63) y la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (número de procedimiento: A1298314026217). En todo momento se trató de minimizar el dolor de los animales de experimentación y reducir el número de los mismos para los diferentes experimentos.

Tabla 1: Número de ejemplares empleado en los distintos experimentos

Experimento	Animales
Caracterización neuronal	38
Estudio causalidad unitaria	
Estudio de la causalidad LFP	10
Estudio de la inactivación MS/DB	8
Reinicio de la fase	16

3.2 METODOLOGÍA ELECTROFISIOLÓGICA

3.2.1 Anestesia y cirugía

Los estudios de registro electrofisiológico se llevaron a cabo bajo anestesia con uretano. El uretano otorga un grado de anestesia útil para la cirugía sin interferir en la actividad eléctrica cerebral (Maggi y Meli, 1986). El uso de uretano permite al animal mantener la actividad neural oscilatoria mientras se encuentra completamente anestesiado.

El grado de anestesia se verificó mediante diferentes reflejos en el animal. Por un lado se observó el reflejo pupilar, comprobando que la pupila se encontrara contraída y localizada en el centro del ojo del animal, símbolo de incoscienza debida a la anestesia. También se atendió al reflejo plantar y de la cola, aplicando presión con unas pinzas en el extremo de la cola del animal, o entre los dedos de la pata, y comprobando que no se producía retirada de las extremidades. Complementariamente, el registro de potencial de campo en el hipocampo en animales anestesiados con uretano, permite monitorizar el grado de anestesia. El registro de intracerebral de hipocampo en animales anestesiados con uretano presenta, mayoritariamente, una alternancia espontánea entre una actividad irregular de baja frecuencia y gran amplitud (ondas lentas de 0.5 a 3 Hz) y una actividad rítmica de mayor frecuencia y menor amplitud (ondas theta de 3 a 12 Hz). No obstante, hay que tener en consideración que el efecto del uretano puede producir cierta depleción en la actividad del potencial de campo, por lo que numerosos autores describen las frecuencias theta en rata anestesiada como una actividad de 2.5 a 8 Hz (Leung, 1985).

En nuestros experimentos, se empleó una dosis intraperitoneal de uretano de entre 1.3 y 1.5 g kg⁻¹, preparado en suero salino fisiológico 0.9 %. Con estos niveles de anestesia se observa una predominancia de ondas lentas en reposo, con un incremento de la actividad theta tras la estimulación sensorial de la cola (*tail pinch*) (Bland et al., 1994) o tras la estimulación eléctrica, o química. A niveles de anestesia superiores a 1.5 g kg⁻¹ en rata, el uretano puede deprimir las funciones cardíacas y respiratorias (Maggi y Meli, 1986).

A fin de asegurar un nivel de anestesia que evitara el sufrimiento del animal, se empleó anestesia local como bloqueante de la sensibilidad del área sometida a cirugía. Se administró lidocaína-adrenalina tópica en el oído externo, en la piel y sobre la zona de incisión. Posteriormente, se suministraron 0.3 ml de lidocaína subcutánea en distintos puntos para el bloqueo de la sensibilidad craneal (nervio oftálmico, zigomático y fibras C2).

Tabla 2: Coordenadas de referencia, tomadas desde Bregma

Núcleo	Antero-Posterior	Lateral	Dorso-Ventral
HPC	−3.5	2.5	3.0
RPO	−8.0	1.5	8.5
NI	−9.7	0.0	7.4–7.8
MS/DB	0.7	0.0–0.5	6.0–7.5

La anestesia con uretano tarda unos 30–45 minutos en hacer efecto, pero permite mantener un nivel estable de sedación durante unas 7 horas tras la administración. En los casos en los que se observó un excesiva dismunición de actividad lenta se emplearon dosis suplementarias de anestesia de 0.3 g kg^{-1} . Tras asegurar la pérdida de reflejo pupilar y podal, se rasuró la cabeza del animal y se le colocó en el cuadro estereotáxico (SR-6R, Narishige, Japón). Se realizó una incisión medial longitudinal y se retiró el periostio con la ayuda de una espátula quirúrgica.

Se tomaron coordenadas de *bregma* y *lambda*, así como de puntos laterales equidistantes, para corregir la posición del cráneo en el estereotáxico, hasta dejar los puntos de referencia alineados en el plano horizontal (figura 8). La determinación de las coordenadas teóricas de interés se llevó a cabo mediante un atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2004). Dado que las coordenadas están referidas a cráneos con distancia bregma-lambda de 9.0 mm, se aplicó un factor de corrección a las coordenadas teóricas cuando fue necesario.

$$\text{Factor de corrección} = \frac{AP_{bregma} - AP_{interaural}}{9.0}$$

En la tabla 2 se muestran las coordenadas de los núcleos de interés. Posteriormente se detallará que núcleos se emplearon en cada uno de los procedimientos. Una vez marcadas las coordenadas en el cráneo, se realizaron los trepanos, se retiraron las meninges con la ayuda de unas pinzas y, en caso de ser necesario, se trataron las hemorragias con gelatina hemostática.

3.2.2 Registro y estimulación neuronal

Los electrodos fueron llevados a sus coordenadas finales empleando *bregma* como punto de referencia. En el caso de los electrodos de registro de actividad de campo y de estimulación, se fijaron al cráneo mediante resina polimérica dental (Rapid Repair, Dentsply International). Para asegurarse de la buena fija-

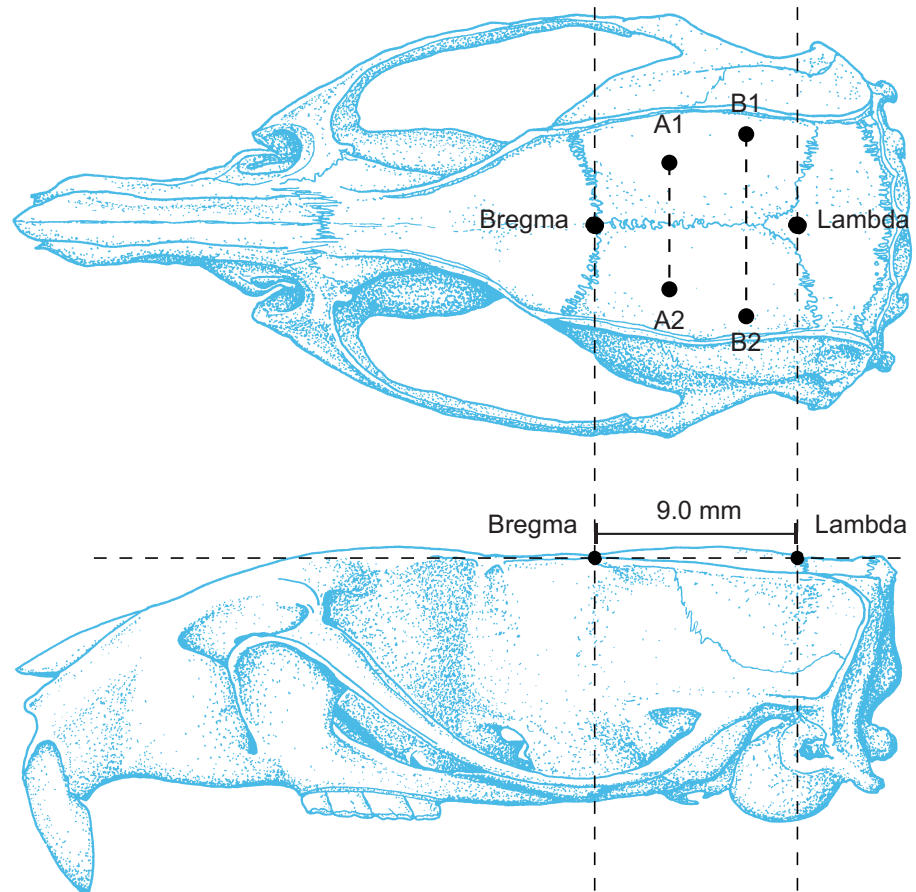


Figura 8: Situación de los puntos de referencia en el cráneo. Se tomaron los puntos bregma (unión de las suturas sagital y coronal) y lambda (unión de la línea interaural con la prolongación de la sutura sagital) como referencia para el marcaje de coordenadas. Estos puntos, separados 9.0 mm, se alinearon en profundidad hasta que quedaron nivelados. Adicionalmente, se tomaron puntos equidistantes A1-A2 y B1-B2, a lo largo de la sutura sagital, para comprobar la posición del cráneo y corregir posibles inclinaciones. Modificado de Paxinos y Watson (2004)

ción del cemento dental, el cráneo se limpió con un algodón empapado en una solución de agua destilada con hipoclorito sódico (40 g l^{-1}) para eliminar restos de sangre y proteínas. Seguidamente, se empleó agua destilada para eliminar los restos de la solución anterior y, finalmente, acetona para deshidratar la zona.

3.2.2.1 *Electrodos de registro de potencial de campo*

Los registros extracelulares de la actividad eléctrica local (*Local Field Potential*, LFP) se llevaron a cabo mediante el empleo de macroelectrodos monopolares de acero inoxidable, recubiertos de *fomvar*, de $120\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro (World Precision Instruments; Aston, Stevenage, UK). La referencia del electrodo se fijó en la piel y se mantuvo humedecida en todo momento para facilitar la conductividad eléctrica.

Los electrodos se colocaron en sus coordenadas estereotáxicas corregidas mientras se visualizaba el potencial de campo en el *software* de adquisición de señal. Debido a que las estructuras estudiadas presentan actividad a frecuencia theta durante ciertos tipos de estimulación, la localización final del electrodo se determinó mediante la observación de un incremento de potencia theta tras la estimulación sensorial del animal. Por último, se aplicó la resina dental para fijarlos al cráneo y reducir la presencia de ruido de fondo en el registro. En todos los experimentos se mantuvo el mismo orden de colocación de electrodos, comenzando siempre por el situado en CA1 de hipocampo.

3.2.2.2 *Electrodos de estimulación eléctrica*

Los electrodos de estimulación eléctrica se confeccionaron a partir de cable de acero inoxidable recubierto de *fomvar* de $120\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro (World Precision Instruments). El cable se trenzó con la ayuda de dos pinzas, retirando ligeramente la cobertura plástica en los extremos con la ayuda de un bisturí. Se dejó una separación entre las puntas de estimulación inferior a 1 mm .

El emplazamiento final de los electrodos de estimulación se realizó atendiendo a sus coordenadas estereotáxicas. No obstante, se aseguró el mismo mediante la aplicación de trenes eléctricos de baja duración e intensidad, que permitieron observar el efecto de la estimulación en el potencial de campo de hipocampo (incremento de frecuencias theta). Una vez visto el aumento de ondas theta tras la estimulación, los electrodos se fijaron al cráneo con resina dental.

3.2.2.3 *Electrodos de registro neuronal unitario*

Para el registro neuronal unitario de la actividad extracelular se emplearon microelectrodos de borosilicato de 1 mm de diámetro (World Precision Instruments) rellenos de una solución de cloruro sódico 3 M en agua destilada. Se comprobó *in vitro*, mediante la ayuda de un multímetro, que la impedancia de los electrodos fuera mayor de 5 M Ω para permitir una relación señal-ruído superior a 3:1.

Los electrodos fueron emplazados en sus coordenadas finales dorsoventrales mediante un micromanipulador estereotáxico electrónico de un solo eje (Narishige, Japón). Desde *bregma* hasta aproximadamente el límite superior del lugar de registro, los electrodos se movieron de forma automática a velocidad de 10 $\mu\text{m s}^{-1}$ para evitar lesionar el tejido. Una vez en el límite superior del núcleo de interés, se buscaron los potenciales de acción extracelulares en incrementos de 1 μm . Una vez encontrada una neurona, el electrodo se movió en incrementos de 0.1 μm para asegurar un registro estable con la mejor relación señal-ruído posible.

3.2.3 *Paradigmas de estimulación*

La estimulación sensorial se llevó a cabo mediante la aplicación de presión en la cola del animal con unas pinzas metálicas (*tail pinch*). En condiciones de anestesia ligera con uretano, el pinzamiento de la cola produce un incremento de potencia en la banda de frecuencias theta en el hipocampo durante la aplicación del estímulo (Bland et al., 1999).

Para las experiencias de estimulación eléctrica, se empleó un generador de pulsos rectangulares S48 (GRASS Technologies; Warwick, USA) acoplado a una unidad SIU5-RF (GRASS Technologies) para minimizar artefactos en el registro y mantener la intensidad de estimulación constante. El generador de pulsos se conectó al sistema de adquisición para tener registro de los estímulos dados. Los parámetros de estimulación empleados se explicarán en cada procedimiento.

Como paradigma de estimulación química, se empleó el agonista colinérgico carbacol 0.1 μl , 0.156 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ en suero salino a un flujo de 0.1 $\mu\text{l min}^{-1}$ (Cervera-Ferri et al., 2011). El control de estas experiencias consistió en la inyección, previa al carbacol, de suero salino (0.1 μl 0.9 % a 0.1 $\mu\text{l min}^{-1}$) en el mismo animal. Se realizó una única inyección de carbacol por animal.

3.2.4 *Adquisición de la señal*

Los electrodos de registro de potencial de campo fueron conectados al sistema de registro mediante un preamplificador (P55, GRASS Technologies) y un amplificador de cuatro canales (AMPLI 4G21, Cibertec). La señal fue amplificada 1000 veces, filtrada entre 0.3 y 300 Hz y adquirida a 1000 Hz. En el caso del registro unitario, el electrodo fue preamplificado (DAM80; World Precision Instruments) y llevado al amplificador de cuatro canales (AMPLI 4G21, Cibertec). La señal fue amplificada 10 000 veces, filtrada entre 300 y 5000 Hz y adquirida a una frecuencia de muestreo de 16 000 Hz.

Todas las señales fueron llevadas desde el amplificador hasta la unidad de adquisición (CED Micro 1401; Cambridge Electronics Design, UK), conectada por USB al ordenador. Para la visualización y adquisición de los datos, se empleó el *software* Spike2 (Cambridge Electronics Design).

3.2.5 *Reducción de interferencias*

La captación de señales ajenas al registro es uno de los principales problemas de los registros electrofisiológicos. La baja amplitud de las señales cerebrales (de 5 a 300 μV) las hace propensas a la aparición de ruido artefactual proveniente de distintas fuentes.

La mayor fuente de ruido es la corriente alterna del sistema eléctrico (50 Hz) así como otras fuentes electromagnéticas. Para evitarlo, se conectaron varios electrodos de tierra tanto al animal como al estereotáxico. Para mejorar el aislamiento se colocó una jaula de Faraday conectada a la toma de tierra general del edificio para apantallar señales externas. Adicionalmente, a todos los registros se les aplicó un filtro Butterworth de supresión de banda (de 47 a 53 Hz), para evitar las interferencias producidas por la línea eléctrica.

3.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

La posición de los electrodos se comprobó mediante el análisis histológico del encéfalo del animal tras el experimento. Al acabar los procedimientos, los animales fueron sacrificados con una dosis letal (0.5 a 1 ml) de pentobarbital sódico (1 mg kg^{-1} 20 %, Dolethal Vetoquinol; Madrid, España) suministrado por vía intraperitoneal. Previo a que el corazón dejase de latir, se realizó una incisión cutánea longitudinal en la línea media de la parte anterior del abdomen hasta el esternón. Se seccionó el diafragma dejando expuesto el corazón. Se introdujo una cánula sin filo, de

1 mm de diámetro, por el ventrículo izquierdo y, con sumo cuidado, se llevó hasta el inicio de la aorta ascendente. Se pinzó la cánula para evitar su salida y se empleó una bomba de perfusión (PERCOM N-M; J.P.Selecta).

El primer líquido de perfusión empleado fue unos 500 ml de suero salino isotónico (0.9 %) heparinizado al 0.1 % para asegurar la limpieza de los vasos sanguíneos. Con el fin de desalojar la sangre y el suero del sistema circulatorio, se practicó una incisión en la aurícula derecha. Una vez el flujo de salida tuvo un color transparente, se pasó un volumen de 500 ml de solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) en tampón fosfato (0.1 M, $pH = 7.4$) a unos 20 ml min^{-1} .

Tras finalizar el proceso se extrajo el encéfalo, conservándolo durante unas 24 h en PFA. Pasado este tiempo, se aplicó un par de lavados con una solución de sacarosa al 30 % en tampón fosfato salino (0.2 M, $pH = 7.2$), para eliminar los restos de PFA, y se conservó a 4°C en dicha solución durante 48 h para, posteriormente, realizar las secciones del material histológico. La solución de sacarosa crioprotege a la muestra, permitiendo cortarla mediante un microtomo de congelación, sin que el tejido sufra daños durante el proceso de congelación.

Se eliminó la parte anterior (bulbo olfatorio) y posterior (médula espinal) de los encéfalos y se seccionaron coronalmente, separándolos en dos trozos para facilitar la congelación y el corte. Los cortes se realizaron mediante un microtomo de congelación SM2000 R (Leica Biosystems; Wetzlar, Alemania) conectado a una unidad de congelación Frigomobil (Leica). La pletina del microtomo se mantuvo a -30°C durante el proceso de congelación de las muestras. Se colocaron las secciones de encéfalo en la pletina y se congelaron añadiendo poco a poco la solución de sacarosa tamponada, de forma que se hiciera un bloque de hielo alrededor de las muestras fijadas a la base.

Los cortes se realizaron en el plano coronal con un grosor de $40 \mu\text{m}$. La temperatura de la pletina fue alterándose a medida que avanzaba el proceso de corte, modulándola cuando fue necesario. Los cortes se recogieron en cinco series consecutivas en tubos Eppendorf de 1.5 ml rellenos con tampón fosfato salino con azida (0.2 M, $pH = 7.4$). Las series se almacenaron a 4°C hasta su posterior procesamiento.

El montaje de las series se realizó sobre portaobjetos gelatinizados con una solución de gelatina al 0.5 % y alumbre de cromo al 0.05 % en agua destilada. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente hasta estar completamente secos, momento en que se realizó la tinción citoarquitectónica Giemsa, modificada de Iñiguez *et al.* (1985). Los portaobjetos, con los cortes mon-

tados, fueron sumergidos 2 min en etanol 96°, 2 min en etanol 70° y, finalmente, en agua doble destilada durante otros 2 min. De esta forma se rehidrataban los cortes y eliminaban posibles impurezas. Posteriormente, los portaobjetos se introdujeron en un baño de KH_2PO_4 a 60 °C durante 3 min para, seguidamente, sumergirlos durante 10 min en una dilución 1/10 de la solución de Giemsa a 60 °C en agitación. Pasado este tiempo los cortes se aclararon un par de veces con agua doble destilada y se sometieron a tres baños, de 5 min cada uno, en KH_2PO_4 a temperatura ambiente, en agitación.

Los portaobjetos teñidos fueron sometidos a una batería de deshidratación en alcoholes de concentración creciente, se aclararon con un par de baños en xileno y se cubrieron con el medio de montaje comercial DPX (Merck; Darmstadt, Alemania). La comprobación de la colocación de los electrodos se realizó mediante la observación de las muestras en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon; Tokio, Japón) y la ayuda del atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2004). Los ejemplares cuyos electrodos estaban desplazados de los núcleos de interés fueron apartados de los análisis o empleados como controles de estimulación.

3.4 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos registrados en las adquisiciones de las medidas de campo eléctrico, en los diferentes experimentos, se abordaron siguiendo diferentes métodos analíticos, según la naturaleza de las medidas.

En los registros del potencial de campo eléctrico o LFP, la señal adquirida muestra variaciones oscilatorias que llevan al uso de métodos espectrales que consigan separar los diferentes componentes frecuenciales. La transformación de las señales originales del dominio del tiempo al dominio de las frecuencias, facilita el reconocimiento de patrones de actividad neuronal poblacional. Éste fue el caso de los registros LFP de hipocampo, que constituyeron parte del estudio que se aborda en este trabajo.

El grueso de nuestro planteamiento se basó en el análisis de la actividad individual de los diferentes tipos neuronales del NI. Los registros unitarios necesitan de un procesamiento particular en el que los datos continuos crudos se emplean para extraer los momentos precisos donde se produce un potencial de acción extracelular. En este caso, el análisis se basa en vectores binarios en los que los tiempos de las espigas detectadas quedan marcados con el valor 1.

Sin embargo, el análisis último pasa por combinar ambos tipos de información y, con ello, poder correlacionar las actividades poblacionales del hipocampo y el núcleo incertus.

3.4.1 Identificación de potenciales de acción en registros unitarios

La identificación de los potenciales de acción se llevó a cabo *offline* mediante el paquete de análisis del *software* de adquisición de señal Spike2. La separación de los potenciales de acción se realizó de forma automatizada atendiendo a dos factores principales:

- I. **Umbral de voltaje:** En los registros unitarios resulta fundamental discernir los potenciales de acción, detectados desde el espacio extracelular, de la actividad poblacional de fondo (o ruido de fondo) presente en la zona de registro. Por ello, solo aquellas espigas que destaquen en amplitud del ruido de fondo podrán aislarse con seguridad. Diferencias señal-ruido por debajo de una proporción de 3 : 1 complican el proceso de aislamiento de espigas, pudiendo producir artefactos en el análisis. Como se observa en la figura 9 A, la colocación de un umbral de voltaje óptimo permite separar los eventos que atraviesen dicho umbral, aislándolos del ruido de fondo. Sin embargo, este método no es suficiente para poder separar espigas de las diferentes neuronas en un mismo registro.
- II. **Forma del potencial de acción:** Una vez que una espiga es separada por umbrales, genera una plantilla. La siguiente espiga detectada es alineada con el máximo positivo de las plantillas existentes para calcular sus distancias euclideáneas. Si estas diferencias entran dentro del 35 % de dispersión respecto a la plantilla, la espiga es clasificada como perteneciente a dicho grupo. Si no, se generará una nueva plantilla que permitirá comparar disparos posteriores. Con cada nueva inclusión de una espiga la plantilla es modificada, apantallando así los posibles efectos de variaciones de amplitud de una espiga en el registro (figura 9 B).

Si bien la separación de espigas es un proceso automatizado, en todo momento se supervisó el progreso de creación de plantillas, modulando los umbrales para mejorar el ajuste, siempre que fue necesario.

3.4.2 Agrupamiento de espigas

La naturaleza del registro de potenciales de acción extracelular hace necesario tener en cuenta ciertos detalles relacionados con la separación de espigas neuronales. Los registros unitarios recogen la actividad de neuronas situadas en las inmediaciones del punto de registro. Si la cercanía a una neurona, y no a otras,

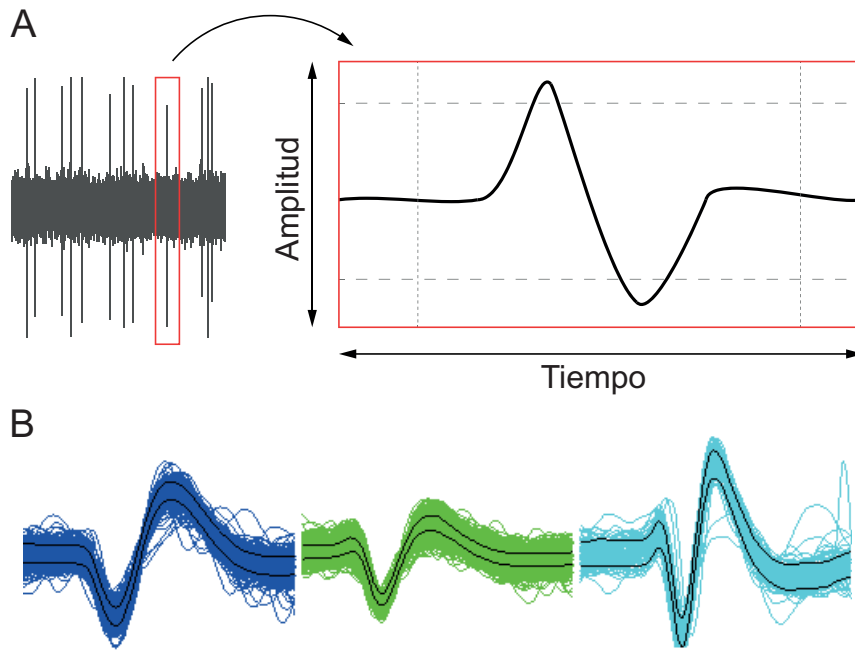


Figura 9: Identificación de potenciales de acción. **A.** Para llevar a cabo la extracción de los potenciales de acción del registro, se colocaron umbrales de voltaje (líneas punteadas horizontales), a fin de evitar el ruido de fondo del registro. Adicionalmente, umbrales temporales (líneas punteadas verticales) se emplazaron para delimitar temporalmente dichos potenciales de acción. **B.** Una vez separadas, las espigas se agruparon automáticamente por análisis de colisión. Los potenciales de acción fueron colocados en el grupo cuya forma se aproximara más a la de la espiga detectada (con un intervalo del 35 % de dispersión).

destaca en un registro las amplitudes de las espigas detectadas serán más o menos constantes, siendo indicativo de que la señal pertenece a una única neurona. Por el contrario, si la punta del electrodo alcanza la actividad de mas de una neurona, se hace necesario separar las diferentes espigas neuronales. Adicionalmente, en ocasiones los registros presentan una inestabilidad temporal que provoca modificaciones de amplitud en las espigas de una misma neurona y, por tanto, puede interferir en la clasificación de los potenciales de acción. Estas situaciones requieren de algoritmos que aseguren el correcto agrupamiento de las distintas espigas neuronales registradas. Está bien extendido el uso del análisis de componentes principales (*Principal Components Analysis*, PCA) para la correcta agrupación de espigas neuronales.

El PCA es un procedimiento estadístico que convierte un conjunto de variables, posiblemente correlacionadas, en un conjunto de valores de variables linealmente no correlacionadas, denominadas componentes principales. Aplicado a la agrupación de espigas, permite agrupar conjuntos de variables basadas en diferentes parámetros del potencial de acción, tales como su duración, las posiciones de su máximo y mínimo o el área que ocupa. Matemáticamente, el PCA toma una gran cantidad de datos relacionados y los convierte en medidas independientes, de forma que pueden ser ordenadas en función de su importancia relativa para el agrupamiento (*clustering*) (Lewicki, 1998). Normalmente, los tres primeros componentes tienen suficiente carga estadística (en torno al 75 %) para ser válidos para el *clustering*, mientras que el resto no aportan suficiente resolución analítica.

En nuestro análisis, los componentes principales se representaron en un gráfico de dispersión tridimensional para visualizar el agrupamiento propuesto. Estadísticamente se aplicó el algoritmo *k-means* supervisado para determinar la clasificación definitiva. Antes de darlos por válidos, los agrupamientos de espigas fueron sometidos a un control de incongruencias mediante el cálculo de sus intervalos interespiga. Este cálculo nos permite detectar la presencia de distancias entre espigas menores a 2 ms, valor correspondiente al periodo refractario típico. Este detalle permitió evaluar los agrupamientos erróneos, llevando a repetir el proceso con parámetros de agrupamiento mas ajustados.

3.4.3 Análisis de la actividad unitaria

Las espigas provenientes de registros unitarios fueron convertidas a una sucesión binaria, siendo 1 las localizaciones de las espigas en el tiempo (evento de disparo) y 0 los tiempos con ausencia de espigas. Estos vectores se complementaron con otros

que mantuvieron la información temporal de la posición de las espigas.

A partir de estos valores se calcularon parámetros que definiesen la métrica de los disparos neuronales. La tasa de disparo de las neuronas se calculó como el número de espigas por segundo, a partir de los segmentos analizados. El histograma de intervalos interespiga (*Interspike Interval Histogram*, ISIH) se realizó a partir de los tiempos entre disparos de la neurona. Los datos se ajustaron a una distribución inversa de la gaussiana para obtener otra estimación equivalente de la tasa de disparo, siendo uno dividido entre el tiempo del pico máximo de la distribución.

Además, la determinación del ISIH proporcionó datos para extraer el coeficiente de variación (CV). El CV puede considerarse una medida de la regularidad de la actividad neuronal, calculado como la desviación típica de los intervalos interespiga dividido entre la media de los mismos. Valores inferiores a 0.5 son propios de actividad de disparo regular. No obstante, el CV no nos proporciona una idea real de la ritmicidad de la neurona. Para determinar lo rítmico de la actividad de disparo, de las neuronas con CV menor que 0.5, se determinó el histograma de autocorrelación (*Autocorrelation Histogram*, ACH), representado en el dominio del tiempo. Si los eventos de disparo suceden de forma constante, el ACH presenta un perfil periódico sinusoidal. Ajustando el ACH a una función seno y realizando el promedio entre los tres primeros picos y los tres primeros valles de dicho ajuste, podemos calcular el índice de ritmicidad (*Rhythmicity Index*, RI) (Apartis et al., 1998). Neuronas con CV de variación menores que 0.5 y RI mayores que 0.95 fueron clasificadas como rítmicas.

Finalmente, se estudió la presencia de actividad a ráfagas en los patrones de disparo de las neuronas. Si una neurona presenta un patrón de ráfagas periódico, su ISIH muestra una clara bimodalidad (Cocatre-Zilgien y Delcomyn, 1992). Para determinar este tipo de actividad, se calculó el estadístico de dispersión de Hartigan (Freeman y Dale, 2013), siendo los p -valores menores que 0.05 indicativos de actividad a ráfagas.

Parte de los análisis planteados en este estudio requieren de la correlación conjunta entre la actividad unitaria y la poblacional, en nuestro caso, la actividad de neuronas del NI y la actividad oscilatoria de hipocampo. Con el propósito de facilitar la comparativa entre ambas actividades, se determinó la función de densidad de espigas (*Spike Density Function*, SDF) la cual permite convertir los eventos referentes a los tiempos de disparo de las neuronas en una señal con el mismo muestreo que los registros LFP (Szucs, 1998). Esta señal unitaria convertida permite aplicar la misma metodología analítica empleada para las señales LFP,

permitiendo así observar las variaciones temporales de la actividad unitaria temporal. La obtención de esta señal «continua» se realizó mediante la convolución de los eventos aislados con una función de convolución o *kernel*. Con este método se genera una señal por combinatoria de otras dos, siendo una de ellas la señal problema y la otra una función de convolución.

Para convolucionar los disparos se evaluaron distintos tipos de kernel (figura 10) seleccionando aquel que se amoldara mejor a la actividad real de la neurona, atendiendo a los parámetros calculados previamente para cada tipo neuronal. La función *sinc* ($\sin(x)/x$) demostró un buen ajuste aunque generó actividad «fantasma» no presente en el registro unitario. Por ello, se convolucionaron definitivamente los eventos mediante una ventana *Blackman-Harris*, la cual proporcionó una actividad mas próxima a la real. Se seleccionó un ancho de ventana de entre 1000 y 5000 puntos, dependiendo de la tasa de disparo de la neurona. De esta forma, se consiguió mitigar la aparición de actividad falsa debido al ancho del kernel (Shimazaki y Shinomoto, 2010). Tras la convolución, se añadió un 10 % de ruido blanco (o ruido gaussiano) a la señal para simular el ruido estocástico encontrado en los registros de potencial de campo local (Kocsis y Kamiński, 2006). Finalmente, se equiparó la frecuencia de muestreo a la marcada por las señales LFP del registro.

3.4.4 Análisis tiempo-frecuencia

El análisis relativo a la composición de las oscilaciones LFP, o de las derivadas del registro unitario, se llevó a cabo en el dominio del tiempo-frecuencia mediante el análisis *wavelet*. En nuestro caso se utilizó la wavelet de Morlet como wavelet madre, extendida en la analítica de señales biométricas (Torrence y Compo, 1998). Brevemente, cualquier señal adquirida como una secuencia discreta de puntos, puede ser descompuesta en un conjunto de ondas sinusoidales, de diferentes frecuencias, empleando la transformada rápida de Fourier. No obstante, esta aproximación da una imagen estática de un proceso temporal, ya que su resolución se sostiene únicamente en el dominio de las frecuencias, condicionando los análisis a señales estacionarias. Para superar este escollo puede aplicarse la denominada transformada de Fourier de tiempo reducido (*Short Time Fourier Transform*, STFT) que permite obtener una descomposición de la señal en el dominio tiempo-frecuencia. Para ello, una función ventana (normalmente de tipo gaussiano) es multiplicada por la función a transformar, dando una transformada resultante que es empleada como ventana de muestreo temporal. El problema de la STFT radica en su resolución fija, es decir, presenta un ta-

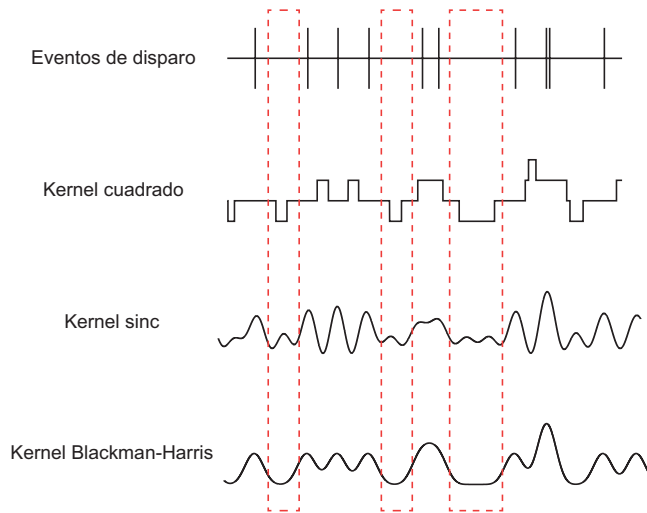


Figura 10: Diferentes ventanas de convolución. Los eventos de disparo binarizados fueron convolucionados para llevar a cabo el análisis wavelet. En el primer ejemplo de ventana (*kernel*) de convolución, se puede observar un *kernel* cuadrado, muy empleado en las señales digitales. Se desechó en este estudio por no ser representativo de una actividad fisiológica. Como puede apreciarse en los recuadrados con líneas punteadas rojas, la ventana *sinc* mostró actividad fantasma no encontrada en el registro. El *kernel* Blackman-Harris mostró una actividad fiel a la presentada por los eventos de disparo, por lo que fue seleccionado para el análisis.

maño fijo de ventana de muestreo. Así pues, ventanas amplias dan una buena resolución de frecuencias pero deficiente resolución temporal mientras que, ventanas estrechas de convolución proporcionan buena resolución temporal pero una escasa resolución espectral (Allen, 1977).

El estudio de señales no estacionarias, como lo son las provenientes de registros electrofisiológicos, requiere de una alta resolución tiempo-frecuencia, por lo que se hace necesario emplear una aproximación matemática ajena a la STFT. Es así como se introduce el análisis mediante la transformada continua wavelet (*Continuous Wavelet Transform, CWT*). A diferencia de las sinusoidales infinitas de energía dispersa empleadas por Fourier, el análisis wavelet emplea «ondículas» (wavelets) de duración finita cuya energía está concentrada en el tiempo alrededor de un punto, lo que las convierte en potentes herramientas para el análisis de fenómenos transitorios, no estacionarios y discontinuos (figura 11 A).

La potencia analítica de la CWT en el dominio tiempo-frecuencia estriba en dos propiedades básicas: dilatación y traslación. La dilatación de las wavelets permite amoldarlas a la frecuencia de la señal en la ventana dada, mientras que su traslación (o desfase) proporciona la resolución temporal (figura 11 B).

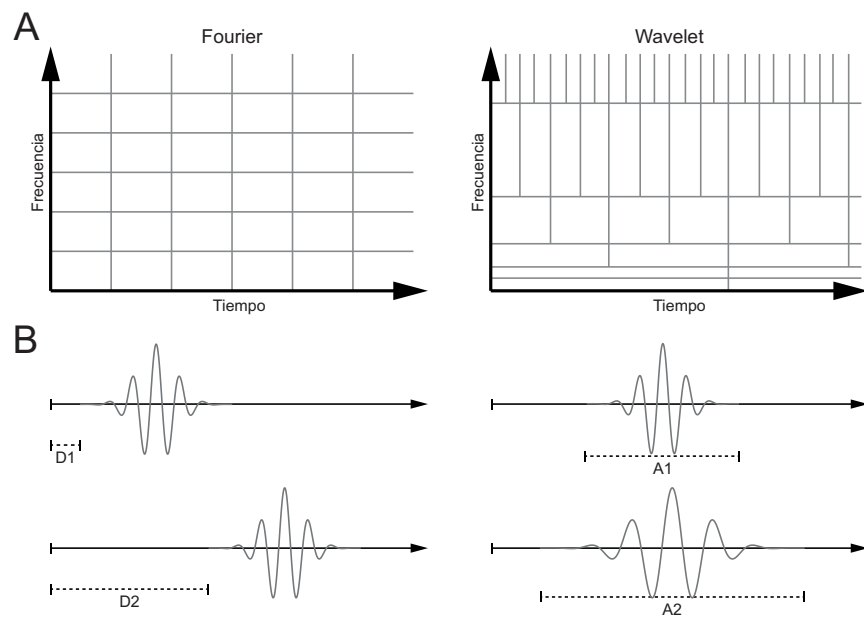


Figura 11: Fundamentos del análisis wavelet. A. Izquierda: La transformada de Fourier proporciona ventanas estáticas de análisis, apropiadas para un único rango de frecuencias. Derecha: Por contra, el análisis wavelet permite una mejor resolución tiempo-frecuencia ya que puede amoldarse según el rango de frecuencias estudiados. B. Las ventanas wavelet se amoldan mediante sus dos propiedades básicas. La traslación (izquierda) permite el movimiento de las ventanas a lo largo del tiempo, mientras que la dilatación (derecha) ensancha o contrae la función wavelet según la frecuencia analizada.

A continuación se proporciona una escueta explicación matemática sobre la CWT.

Tomemos una serie temporal χ_n muestreada a una frecuencia constante δt . Para calcular la CWT se necesita de una función wavelet previa dependiente de un parámetro temporal, no dimensional, η . Para que sea válida como función wavelet (condición de admisibilidad), debe tener media cero y encontrarse localizada en los dominios tiempo y frecuencia. Un ejemplo que cumple estas premisas es la wavelet de Morlet, consistente en una onda plana modulada por una gaussiana:

$$\Psi_0(\eta) = \pi^{-1/4} e^{i\omega_0\eta} e^{-\eta^2/2}$$

siendo ω_0 una constante de valor 6 que permite cumplir la condición de admisibilidad (Farge, 1992). La transformada wavelet continua de una señal discreta χ_n en un tiempo y escala determinados (n, s) puede ser definida como la convolución de χ_n mediante una versión escalada y desfasada de la función wavelet:

$$W_n(s) = \sum_{n'=0}^{N-1} \chi_{n'} \Psi * \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

donde $*$ indica el complejo conjugado y Ψ la versión normalizada, a energía unitaria, de Ψ_0 . Esta normalización es necesaria para poder comparar wavelets con una escala s con cualquier otro wavelet de s distinta, o de misma s pero de diferentes sucesiones temporales. La fórmula normalizada puede ser definida como:

$$\Psi \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right] = \left(\frac{\delta t}{s} \right)^{1/2} \Psi_0 \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

A partir de la cual se obtiene la ecuación que define la función wavelet normalizada a energía unitaria:

$$W_n(s) = \sum_{n'=0}^{N-1} \chi_{n'} \left(\frac{\delta t}{s} \right)^{1/2} \Psi_0 \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

3.4.4.1 Análisis espectral

Debido a que la función wavelet de Morlet, $\Psi(\eta)$, es una función compleja, puede descomponerse en sus partes real, $\Re\{W_n(s)\}$, e imaginaria, $\Im\{W_n(s)\}$. Así, la amplitud de la señal puede ser calculada como el módulo de su parte real: $|W_n(s)|$. Por su parte, la fase puede calcularse como el arcotangente de la división entre las partes imaginaria $W_n(s)$ y real:

$$\phi(s) = \tan^{-1} \frac{\Im[W_n(s)]}{\Re[W_n(s)]}$$

Por último, la potencia de la señal a una frecuencia determinada (escala) puede definirse como el cuadrado del módulo de la amplitud: $|W_n(s)|^2$. En este trabajo, la potencia se calculó como el módulo al cuadrado de la amplitud normalizado a la escala: $(|W_n(s)|^2)/s$. Esta normalización resulta adecuada si se considera que las potencias wavelets mantienen una relación inversa con las frecuencias ($1/f$), evitando así los problemas de sesgo de valores dependientes de escala (Liu et al., 2007). La representación de los espectrogramas wavelet se realizó aplicando una estandarización de tipo *z-score* para resaltar las altas frecuencias, que de otro modo quedan enmascaradas por la potencia de las bandas de baja frecuencia.

3.4.4.2 Medidas de sincronización

Un primer análisis de la relación entre distintas señales se realizó mediante el espectrograma cruzado wavelet. Dadas dos series temporales X e Y , el espectrograma cruzado wavelet puede definirse como el producto $W_n^{XY}(s) = W_n^X(s)W_n^{Y*}(s)$, donde $W_n^{Y*}(s)$ representa el complejo conjugado de $W_n^Y(s)$. La potencia del espectrograma cruzado viene dada por el módulo del producto conjugado $|W_n^{XY}(s)|$. La representación de los espectrogramas cruzados se realizó con una resolución de 0.01 bin y mediante escala colorimétrica, siendo tonos azules indicativos de menor potencia y tonos rojos indicativos de mayor potencia.

Para refinar el estudio de la interacción entre las diferentes actividades neuronales, se llevó a cabo el análisis de la coherencia wavelet, la cual nos permite determinar correlaciones lineales entre las distintas señales. La coherencia ($C(s)$) puede definirse como la proporción entre el espectrograma cruzado respecto del producto de los auto-espectrogramas de las dos señales o series temporales:

$$C(s) = \frac{S(s^{-1} |W^{XY}(s)|^2)}{S(s^{-1} |W^{XX}(s)|^2) \cdot S(s^{-1} |W^{YY}(s)|^2)}$$

siendo W^{XY} el espectrograma cruzado, W^{XX} y W^{YY} los auto-espectrogramas de ambas señales y S un parámetro wavelet de suavizado espacio-temporal (Torrence y Webster, 1998). La definición matemática de coherencia se asemeja a la del coeficiente de correlación de Pearson, por lo que se puede pensar en la coherencia como un coeficiente de correlación localizado en el dominio tiempo-frecuencia (Grinsted et al., 2004). Se realizó una representación colorimétrica de la cantidad de coherencia a distintas frecuencias respecto al tiempo (coherograma).

Ambas medidas evidencian la correlación de las series temporales basándose en la similitud de sus amplitudes o en las dife-

rencias de fase entre ambas señales. Cuando se demuestra que dos señales son coherentes entre sí, resulta útil ampliar el estudio aislando las diferencias de fase y descartando tramos en los que la correlación es exclusiva de la similitud de amplitudes. La sincronización de fase se refiere a la situación en la que las fases de dos osciladores acoplados se sincronizan, a pesar de que sus amplitudes puedan no estarlo. Por consiguiente, para cualquier tiempo t se cumple que:

$$\varphi_{xy}(t) = |\phi_x(t) - \phi_y(t)| \leq \text{cte}$$

donde $\phi_x(t)$ y $\phi_y(t)$ son las fases de las señales $x(t)$ y $y(t)$, respectivamente. En sistemas experimentales, a menudo las señales son ruidosas y pueden presentar saltos aleatorios de fase 2π . Por lo tanto, es preferible hacer uso de la fase relativa cíclica, es decir, la diferencia de fase relativa en el intervalo $[0, 2\pi]$, definida como

$$\varphi_{\text{rel},xy}(t) = \varphi_{xy}(t) \bmod 2\pi$$

Estas diferencias de fase se traducen en ángulos que pueden representarse en un diagrama polar y estudiar la uniformidad de su distribución mediante estadística circular. La sincronización de las fases se estudió mediante el análisis de las diferencias de fases obtenidas a partir del espectrograma wavelet cruzado (Borhegyi et al., 2004; Li et al., 2007).

La distribución de ángulos fue analizada con pruebas de estadística circular (Fisher, 1993) mediante la librería CircStat de MATLAB (Berens, 2009). Para examinar la uniformidad de la distribución se utilizó el test de uniformidad de Rayleigh, siendo un p -valor inferior a 0.05 indicativo del acoplamiento de fases significativo entre ambas señales. Siguiendo a Lachaux et al. (1999), el acoplamiento de fase (*Phase Locking Value*, PLV) se define como,

$$\text{PLV} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N e^{i\varphi_{\text{rel},xy}(t_n)}$$

El PLV estima cómo se distribuye la fase relativa sobre el círculo unidad. Cuando existe una fuerte sincronización, la distribución de los valores de la fase relativa ocupan una pequeña porción del círculo, es decir, con una varianza muy pequeña, siendo en este caso los valores de PLV cercanos a 1. Por el contrario, cuando los sistemas no están sincronizados, la distribución de las fases se extiende por todo el círculo y el PLV toma valores muy bajos cercanos a 0 (figura 12).

Para determinar si el acoplamiento era significativo, o ambas series temporales eran independientes (hipótesis nula), se generaron datos «artificiales» que mantuvieran las propiedades estadísticas de los datos originales (Schreiber y Schmitz, 2000). Se

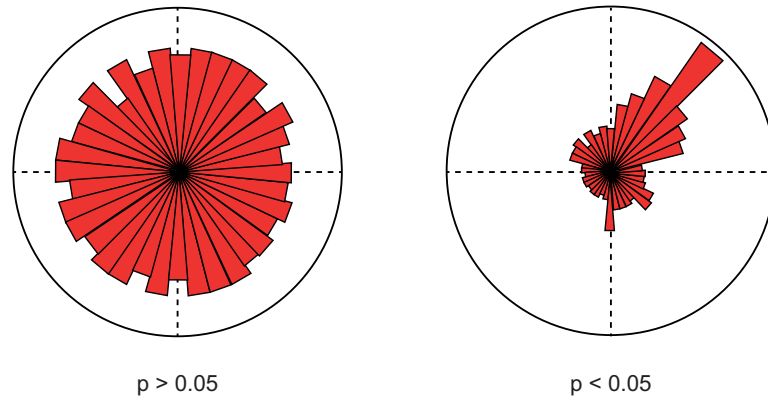


Figura 12: Test de uniformidad de fases de Rayleigh. Si la distribución de ángulos no tiene una preferencia clara, el diagrama de rosas muestra una distribución uniforme, con un p -valor mayor que el umbral de significación (izquierda). Por el contrario, si existe una preferencia de fases, el diagrama muestra un grupo de ángulos predominantes, con significación estadística según el test de uniformidad de Rayleigh (derecha).

empleó el método S3 de Hurtado *et al.* (2004), para mantener la estructura temporal de la frecuencia instantánea de las series temporales. Se calculó el PLV de las series generadas para determinar la posibilidad de falsos positivos de acoplamiento a un nivel de significación dado (Lachaux *et al.*, 1999).

Las medidas descritas hasta ahora se basan en correlaciones lineales entre señales bioeléctricas dependientes de la estacionariedad de las mismas. En determinadas ocasiones dos señales pueden mantener entre si relaciones no lineales que escapan a los análisis convencionales. Para estos casos se hace necesario emplear medidas basadas en la Teoría de la Información de Shannon (1948).

La información mutua (*Mutual information*, MI) proporciona una medida de la dependencia mutua existente entre dos variables. En el análisis de señales, la MI nos proporciona un reflejo del grado de dependencia entre dos series temporales dadas, como las obtenidas en los registros LFP. La información mutua permite identificar relaciones no lineales entre señales neuronales, las cuales suelen ser subestimadas por los métodos lineales (Freiwald *et al.*, 1999).

Para el cálculo de la MI se extrajeron subgrupos de matrices de potencia wavelet de entre 3 y 8 Hz de las señales a comparar. Se aplicó el concepto de entropía de Shannon a las distribuciones de potencia wavelet. Según Claude Shannon (1948), la entropía de Shannon puede ser definida como:

$$H(x) = - \sum_{i=1}^{N_x} p_x(i) \cdot \log_2 p_x(i)$$

donde $p_x(i)$ representa la frecuencia relativa del bin i ($\sum_i p_x(i) = 1$). La entropía de Shannon para la distribución conjunta se define como:

$$H(X, Y) = - \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_y} p_{xy}(i, j) \cdot \log_2 p_{xy}(i, j)$$

La información mutua se calculó como:

$$MI(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y)$$

donde X e Y son las distribuciones de potencia de ambas señales. Este valor puede interpretarse como una medida del trasiego de información entre dos fuentes.

3.4.4.3 *Análisis de la actividad asociada a la oscilación theta*

El análisis de la actividad asociada a la ritmicidad theta se realizó con una variante del índice de propensión al ritmo theta (*Theta Propensity Index*, TPI) descrito por Varga *et al.* (2008). Para ello, se detectaron los máximos locales en la banda de frecuencias theta en el último cuartil de los espectrogramas de potencia wavelet (Roux *et al.*, 2007). Los tiempos correspondientes a tales puntos se emplearon como medida de la proporción temporal con presencia de theta significativo en ambas señales, ya que se calcularon los tiempos en los que la potencia era máxima. El TPI se definió como la proporción de tiempo en que una, o ambas señales, se encuentran en la banda theta, con potencia significativa.

Como parámetro complementario se empleó lo que denominamos como «tiempo compartido en theta» o *Shared Theta Time* (STT). Mientras que el TPI mide el tiempo en theta de uno, otro o ambas actividades neurales, el STT ofrece una medida del tiempo común en el que ambas actividades oscilan en banda theta (rango de 0 a 1, siendo 1 el 100 % de tiempo compartido).

3.4.5 *Análisis de la causalidad entre señales neurales*

Uno de los problemas que se puede abordar en la analítica de señales es el estudio de la direccionalidad del trasiego de información entre dos fuentes. Los métodos espectrales presentados hasta el momento nos permiten evaluar la existencia de correlaciones lineales estáticas entre varias series temporales, si bien no nos permiten determinar el sentido del flujo de la información

transmitida. La naturaleza de las señales bioeléctricas, así como los cambios de activación del sistema estudiado dependientes del momento experimental, hace pensar que la información no se transmitirá en un sentido establecido preferente, sino que presentará variaciones temporales dependientes del estado. De esta forma se hace necesaria la introducción de una metodología que, explícitamente, permita desentrañar el sentido del flujo de información transmitida a lo largo del tiempo y permita observar dinámicas de retroalimentación entre las estructuras participantes del sistema.

Los métodos analíticos regresivos son indicativos de meras correlaciones, por lo que se necesita de una herramienta estadística que nos permita averiguar si los valores observados en una serie temporal son predecibles con los valores de otra serie temporal distinta. De entre los métodos estadísticos más empleados para parametrizar la naturaleza de la comunicación entre dos osciladores, en los últimos años está ganando peso en el ámbito de la neurociencia el concepto de causalidad de Granger. La causalidad, en econometría, fue definida por Granger (1969) como la habilidad de predecir valores en una serie temporal empleando valores pasados de otra serie temporal. Los principios matemáticos subyacentes a la causalidad de Granger pueden ser empleados en analítica de señales neurales para establecer patrones causales entre cualesquiera que sean las dos series temporales.

Para llevar a cabo los análisis de causalidad de Granger se empleó el modelado mediante múltiples vectores de autoregresión (*Multiple Vector Autoregressive*, MVAR) asistido por el paquete *Granger Causal Connectivity Analysis* de MATLAB (Seth, 2010). Para determinar el acoplamiento neuronal temporal entre las señales, y el grado de interacción entre ellas, se emplearon modelos autoregresivos para calcular la causalidad de Granger (Granger, 1969; Seth, 2010).

Según este modelo, dadas dos series temporales X_1 y X_2 , la causalidad de Granger implica que la señal X_2 causa a la señal X_1 si la información presente en X_2 ayuda a predecir el futuro de X_1 (Granger, 1969; Seth y Edelman, 2007). En este modelo, X_2 causará a X_1 si la inclusión de observaciones pasadas de X_2 reduce el error de predicción de X_1 en un modelo de regresión lineal de X_1 y X_2 , comparado con un modelo que incluya únicamente observaciones previas de X_1 .

En nuestro caso, las dinámicas temporales de las dos series temporales $X_1(t)$ y $X_2(t)$ (ambas de longitud T), pueden ser descritas como un modelo autoregresivo bivariado:

$$X_1(t) = \sum_{j=1}^p A_{11,j} X_1(t-j) + \sum_{j=1}^p A_{12,j} X_2(t-j) + \xi_1(t)$$

$$X_2(t) = \sum_{j=1}^p A_{21,j} X_1(t-j) + \sum_{j=1}^p A_{22,j} X_2(t-j) + \xi_2(t)$$

siendo p el máximo número de rezago, u observaciones retrasadas, incluidas en el modelo (orden del modelo, $p < T$), A la matriz de coeficientes del modelo y ξ_1 y ξ_2 los residuos o errores de predicción de cada serie temporal. Si la varianza de ξ_1 (o ξ_2) se reduce por la inclusión de valores de X_2 (o X_1) en la primera (o segunda) ecuación, podremos decir que X_2 (o X_1) causa a X_1 (o X_2), en términos de causalidad de Granger.

El orden del modelo MVAR es esencial para la correcta computación de la causalidad. Un orden con escasas observaciones (p) puede producir problemas de resolución, mientras que uno con demasiadas conlleva una sobrestimación del modelo. Un buen criterio para determinar el orden es aquel que consigue la mínima varianza explicada por el modelo respecto del número de coeficientes a estimar ([Akaike, 1974](#)).

Para poder emplear el análisis de la causalidad de Granger, las señales deben ser parte de un proceso estacionario en covarianza. Un proceso estacionario en su covarianza requiere que los dos primeros momentos estadísticos (media y varianza) de las señales sean constantes en el tiempo. Si bien las señales bioeléctricas presentadas en el estudio son consideradas señales no estacionarias, el parcelamiento de las series temporales permitió que los tramos de estudio fueran considerados como señales estacionarias. No obstante, para determinar si los tramos cumplían el precepto de estacionaridad, se aplicaron las pruebas de Dickey-Fuller aumentada (ADF) y la de Kwiatkowski-Phillips-Schmidt-Shin (KPSS) (para revisión, [Seth 2010](#)). El cálculo de la magnitud de la causalidad de X_1 a X_2 se determinó como:

$$C_{2 \rightarrow 1} = \ln \frac{\text{var}(\xi_{1R(12)})}{\text{var}(\xi_{1U})}$$

donde $\xi_{1R(12)}$ es el residuo obtenido del modelo al omitir el término A_{12} y ξ_{1U} deriva del modelo completo ([Seth, 2010](#)). A partir del modelo, podemos obtener la causalidad de Granger espectral, examinando los componentes de Fourier en el dominio temporal ([Geweke, 1982](#)).

3.5 DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

3.5.1 Experimento 1: Estudio de la conectividad efectiva entre el núcleo incertus y el hipocampo

Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo han demostrado que NI presenta un papel crucial como nodo de la red osciladora theta. Por un lado, la estimulación de NI induce ritmicidad

theta. Además, el ritmo theta hipocámpico sostenido, producido por estimulación pontina (estimulación química o eléctrica en RPO), es eliminado tras la lesión o inhibición de NI (Núñez et al., 2006). En un estudio reciente, hemos demostrado que durante la actividad oscilatoria theta hipocámpica producido por estimulación pontina, tanto NI como hipocampo mostraron actividad oscilatoria sincrónica en frecuencia theta (Cervera-Ferri et al., 2011). En este experimento se planteó estudiar la temporalidad y direccionalidad de las dinámicas en la sincronización entre hipocampo y NI bajo ritmicidad theta generada por estimulación química de RPO.

Se llevó a cabo el registro de potenciales de campo locales en el área CA1 de hipocampo y NI, mediante macroelectrodos monopolares. Los electrodos fueron llevados a un preamplificador P55 (GRASS Technologies), a un amplificador de cuatro canales (Cibertec) y, finalmente, al sistema de adquisición CED (Cambridge Electronics Design). La señal fue amplificada 1000 veces, filtrada entre 0.3 y 300 Hz y adquirida a 1000 Hz. Los datos fueron adquiridos mediante el *software* Spike2 (Cambridge Electronics Design).

El protocolo experimental consistió en el registro de un periodo de actividad espontánea, seguido de una infusión control de suero salino (1 μ l, 0.9 %) y, por último, la micro-inyección del agonista colinérgico carbacol (1 μ l, 10 nM; a 1 μ l min⁻¹), con el fin de generar ritmo theta hipocámpico sostenido. La estimulación química se llevó a cabo en el RPO ipsilateral al hipocampo registrado.

La banda theta se definió entre los 3 a 8 Hz. Para calcular la potencia theta, se calculó la potencia relativa de esta banda respecto a la banda 0.5 a 12 Hz. El periodo control se tomó del primer minuto de cada registro. Se consideró que el carbacol había llegado a su efecto máximo cuando se observó un aumento de la frecuencia dominante por encima de 3 Hz durante, por lo menos, un minuto seguido. Se definió el estado theta estacionario, como aquel en que tanto el LFP de hipocampo como el de NI excedieron el umbral de la potencia theta y alcanzaron la misma frecuencia dominante por, al menos, un minuto. Cinco momentos de estado theta estacionario fueron analizados por cada registro. Se analizó un periodo de transición de un minuto, a mitad de tiempo entre el momento de la inyección y el momento efecto del carbacol.

Las señales se analizaron en el dominio tiempo-frecuencia mediante el análisis wavelet. A partir de las transformadas wavelet de las señales, se calculó la relación temporal entre las distintas bandas y los máximos locales que superaran el último cuartil de potencia. Se realizaron espectrogramas cruzados y coherogra-

mas wavelet para realizar una primera aproximación al estudio de los datos. Se calculó el valor de acoplamiento de fase y se realizaron 300 series de datos mediante el método S₃ de Hurtado (2004), para estudiar la independencia de las series temporales. Finalmente, se determinó la causalidad de Granger (causalidad-G) entre el núcleo incertus e hipocampo de series temporales.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante pruebas paramétricas y no paramétricas conforme fue necesario, tras comprobar la normalidad de los datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha < 0.05$), y su homocedasticidad, mediante la prueba de Levene ($\alpha < 0.05$). Las comparaciones emparejadas se empleó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon como método no paramétrico. La significación estadística para comparaciones múltiples se estimó mediante un ANOVA de rangos de medidas repetidas de Friedman y, posteriormente, se realizó un test de Wilcoxon, con corrección de Bonferroni, para la comparación *post hoc*. Para determinar la preferencia de fase, se estudió la uniformidad de la distribución de los ángulos mediante el test de Rayleigh. El umbral de significación se estableció en el 95 % o del 99 % para mayor significación. Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete estadístico R de "The R project" (<http://www.r-project.org/>). Todos los resultados se dan como media \pm error estándar de la media.

3.5.2 Experimento 2: Estudio de la actividad neuronal del núcleo incertus en presencia de actividad theta hipocámpica

Se llevó a cabo el registro LFP en la CA1 de hipocampo dorsal mediante macroelectrodos monopolares, verificando su correcta posición empleando *tail pinch*, antes de su fijación. El electrodo de LFP fue llevado a un preamplificador P55 (GRASS Technologies), a un amplificador de cuatro canales (Cibertec) y, finalmente, al sistema de adquisición CED (Cambridge Electronics Design). La señal fue amplificada 1000 veces, filtrada entre 0.3 y 300 Hz y adquirida a 1000 Hz.

Por otro lado, se realizó el registro extracelular de las neuronas de NI empleando electrodos capilares de borosilicato rellenos de salino 3 M. El electrodo de registro unitario no se fijó, lo que permitió desplazarlo durante el registro para mejorar la señal y registrar más de una neurona por ejemplar. El electrodo de registro extracelular se llevó a un amplificador DAM80 (World Precision Instruments), al amplificador de cuatro canales (Cibertec) y al sistema de adquisición. Las neuronas fueron registradas a 16 000 Hz y filtradas entre 250 y 5000 Hz. Las señales fueron adquiridas con el *software* Spike2 (Cambridge Electronics Design). Las neuronas fueron aisladas y binarizadas con la ayuda del mó-

dulo de separación de espigas de Spike2. Los registros de campo y los datos relativos a las neuronas aisladas y binarizadas, fueron importados a MATLAB para su procesamiento.

El protocolo experimental consistió en el registro de un periodo de un minuto de actividad espontánea (control), seguido de una estimulación sensorial en la cola del animal de 30 segundos, con el fin de producir ritmo theta hipocámpico. Tras otro periodo control, se realizaron estimulaciones eléctricas de 5 segundos de intensidad variable (pulsos de 0.2 ms, 100~500 μ A, 100 Hz), mediante un electrodo bipolar emplazado en RPO.

La actividad neuronal predominante en los distintos periodos fue calculada a partir del histograma de intervalos interespiga. Se calculó la tasa media de disparo, la frecuencia instantánea, el CV y el ACH. El patrón de regularidad en la actividad de las neuronas se decidió en función del cálculo del RI. Las neuronas con $CV < 0.5$ y $RI > 0.95$ fueron clasificadas como rítmicas. Adicionalmente, se estudió la posibilidad de presencia de neuronas en ráfagas mediante el test de dispersión de Hartigans, con un nivel de significación del 95 %.

Las neuronas fueron clasificadas por el análisis de componentes principales sobre los parámetros de actividad definidos anteriormente. Se realizaron dos clasificaciones atendiendo a diversos factores. Por un lado, se llevó a cabo el agrupamiento, o *clustering*, mediante factores extraídos del potencial de acción promedio de las neuronas (Lewicki, 1998). Las neuronas se alinearon en sus máximos, minimizando así la variabilidad de las formas de los potenciales de acción. Los valores de los dos primeros componentes principales fueron suficientes para la clasificación del total de espigas. La clasificación final se realizó por un procedimiento de agrupamiento "*k-means*", basado en determinar la pertenencia a un determinado grupo por su proximidad a la media de dicho grupo (Duda et al., 2000). Para mejorar el agrupamiento, se eliminaron los valores atípicos cuya distancia de Mahalanobis, desde el centroide de su *cluster*, era mayor que el umbral fijado.

El segundo tipo de agrupamiento PCA se realizó en función del patrón de disparo de las neuronas. Este método se fundamenta en generar un conjunto ordenado de vectores de base ortogonal que evidencien la dirección de los datos con mayor variabilidad. Se generó una matriz donde las filas se correspondían a cada una de las neuronas registradas y las columnas representaban el número de espigas en periodos de 500 ms, en regiones periéstimulo. De esta forma se obtenía una matriz con la actividad de cada neurona antes, durante y después de la estimulación. Al igual que en el caso anterior, los valores de los dos primeros componentes principales fueron suficientes para

clasificar todos los patrones de disparo. En este caso, también se agruparon las neuronas mediante un algoritmo *k-means*, eliminando los valores atípicos que mostraron mayores distancias euclídeas a su centroide que las determinadas por el umbral.

Se estudió la actividad neuronal en relación al ritmo theta hipocámpico (definida como 3–8 Hz). Las espigas neuronales fueron binarizadas y convolucionadas mediante una ventana Blackman-Harris de anchura variable (entre 1000 y 5000 puntos). La frecuencia de muestreo de las señales del hipocampo y del NI se disminuyó a 200 Hz y las series temporales se normalizaron a media 0 y desviación estándar 1. Las señales se analizaron en el dominio tiempo-frecuencia mediante la wavelet continua de Morlet. Se realizaron espectrogramas de cada señal, así como los espectrogramas cruzados de ambas. Se calculó el TPI y el STT para estudiar la relación de actividad en theta entre ambos núcleos. Se calcularon los valores de las diferencias de fase para calcular el PLV, analizándolos mediante el test de uniformidad de Rayleigh. Finalmente, se calcularon los valores de información mutua entre ambas series temporales, a fin de evidenciar posibles relaciones no lineales.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante métodos paramétricos o no paramétricos según su adecuación, tras comprobar las asunciones de normalidad (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.05$ para rechazar) y homocedasticidad (Levene; $p < 0.05$ para rechazar). Para las comparaciones apareadas, se empleó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras emparejadas. Adicionalmente, la prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para las comparaciones no paramétricas entre muestras no emparejadas. La estadística circular para evaluar la preferencia de fases se realizó con la prueba de Rayleigh para la uniformidad de distribuciones de fases (Fisher, 1993). El umbral de significación entre comparaciones fue del 95 % ($p < 0.05$) o del 99 % ($p < 0.01$, como doblemente significativo). Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo usando el paquete estadístico R de *R project* (<http://www.r-project.org/>).

3.5.3 Experimento 3: Estudio de la causalidad entre las neuronas del núcleo incertus y la actividad oscilatoria de hipocampo

Si bien es verdad que los estudios de causalidad entre las señales LFP de hipocampo y NI mostraron cierta direccionalidad, se realizó un segundo estudio de causalidad basado en la actividad unitaria de NI, a fin de determinar las relaciones específicas de cada tipo neuronal con la señal de hipocampo. Para ello se emplearon los mismos registros del experimento sobre la activi-

dad neuronal de NI respecto de la oscilación theta de hipocampo. Para más información sobre el protocolo experimental y la adquisición de datos, consultar el apartado 'Experimento 2: Estudio de la actividad neuronal del núcleo incertus en presencia de actividad theta hipocámpica'.

El análisis de las señales se llevó a cabo en el dominio tiempo-frecuencia mediante la aplicación de la transformada wavelet. Los vectores de eventos de espigas, procedentes de las señales unitarias de NI, se convolucionaron según lo explicado en apartados anteriores. Los registros fueron segmentados en tramos de 2 s solapados un 50 %. Para cada tramo se obtuvo un modelo bivalente (hipocampo y NI) mediante la metodología descrita en el «análisis de la causalidad». El análisis de la causalidad en tiempo-frecuencia se realizó mediante el uso de las librerías de funciones GCCA ([Seth, 2010](#)) y HERMES ([Niso et al., 2013](#)). En primer lugar, se eliminaron tendencias lineales y el valor medio de la señal y se dividió por su desviación estándar. A continuación, se comprobó la condición de estacionaridad mediante la prueba de Dickey-Fuller aumentada (ADF) y la prueba de Kwitkowski, Philips, Schmidt y Shin (KPSS). Para generar el modelo, se estimó su orden mediante el criterio de información de Akaike y, en el cálculo de coeficientes, se utilizó el método de los mínimos cuadrados. Se analizó la viabilidad del modelo obtenido por medio del test de Durbin-Watson, a fin de comprobar que los residuos del modelo no estuviesen correlacionados. Se empleó un test F de Fisher, con corrección de Bonferroni, para determinar las interacciones causales significativas en el dominio temporal.

Para estudiar las interacciones causales en el dominio de la frecuencia, podemos emplear la función de transferencia directa (DTF) ([Kamiński y Blinowska, 1991](#)), la cual está relacionada con la causalidad de Granger, con la diferencia de que nos permite analizar el modelo autoregresivo en el dominio de las frecuencias. Esta transformación es indispensable para la correcta estimación de la propagación de fenómenos puntuales (cómo los disparos neuronales) o para los estudios causales entre disparos neuronales y señales LFP ([Kocsis, 2006](#)). La determinación de picos de causalidad significativa en el dominio de las frecuencias se llevó a cabo mediante la aleatorización de los datos, según el método de los datos sustitutos (*surrogate data*) ([Theiler et al., 1992](#)). Para cada tramo analizado, se generaron 100 conjuntos de datos aleatorizando las fases en el dominio de la frecuencia y, posteriormente, reconstruyendo la señal en el dominio del tiempo. La aleatorización de las fases nos permite destruir la estructura original de la señal. De esta forma, podemos comparar las señales generadas aleatoriamente con la señal original y determi-

nar la validez del proceso causal. El conjunto original de señales se consideró significativamente diferente cuando el p -valor de la comparación resultó inferior a 0.01.

3.5.4 *Experimento 4: Estudio del reinicio de la fase de la oscilación theta hipocámpica tras la estimulación eléctrica del núcleo incertus*

El acoplamiento entre la actividad de NI y el hipocampo descrito previamente (Núñez et al., 2006; Cervera-Ferri et al., 2011) y presentado en este trabajo, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que el NI participara del reinicio de la fase de la oscilación theta de hipocampo. Se sabe que la inhibición del septum medial produce una drástica eliminación del ritmo theta (Winson y Abzug, 1978; Bland et al., 1996; Koenig et al., 2011). Por tanto, se planteó que, en caso de existir un reinicio de la fase tras la estimulación de NI, se realizara la inhibición del SM para estudiar la posible ruta a través de la cual se lleva a cabo dicho reinicio.

Se llevaron a cabo registros LFP en la zona CA1 de hipocampo dorsal de animales anestesiados, mediante la implantación de un macroelectrodo monopolar, verificando su posición con estimulación sensorial del animal. El electrodo fue llevado a un preamplificador P55 (GRASS Technologies), a un amplificador de cuatro canales (Cibertec) y, finalmente, al sistema de adquisición CED (Cambridge Electronics Design). La señal fue amplificada 1000 veces, filtrada entre 0.3 y 300 Hz y adquirida a 1000 Hz. Los datos fueron adquiridos mediante el *software* Spike2 (Cambridge Electronics Design).

El protocolo experimental consistió en el registro de un periodo de un minuto de actividad espontánea (control), seguido de un periodo de un minuto de estimulación eléctrica en NI (200 pulsos de 0.2 ms, 100~500 μ A, 0.1 Hz), mediante un electrodo bipolar trenzado. Finalmente, para estudiar si el reinicio de la fase se producía a través de las proyecciones de NI hacia MS/DB, se realizó la inhibición del MS/DB suministrando de 0.7 a 1 μ l de procaína (20 %) a lo largo de su dimensión dorsoventral. Tras la inhibición, se volvió a realizar el mismo patrón de registro y estimulación descrito anteriormente.

El análisis del reinicio de la fase se llevó a cabo alineando los eventos de los pulsos eléctricos con 1.25 s de los segmentos correspondientes de hipocampo (0.5 s antes del estímulo, 0.75 s tras el estímulo), como puede observarse en la figura 13 A. Los segmentos se filtraron entre 3 y 12 Hz con un filtro FIR Parks-McClellan con bandas de transición entre 4–4.5 Hz y 10–10.5 Hz, para minimizar errores. Se calculó el segmento promedio a partir de todos los segmentos alineados y se realizó el

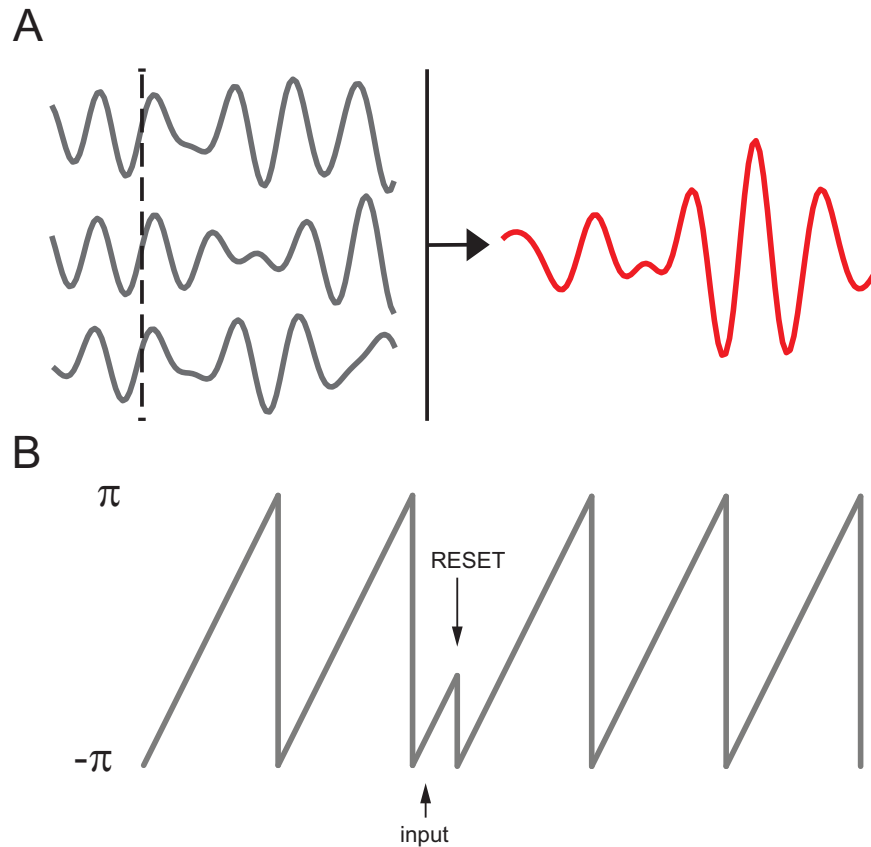


Figura 13: Estudio del reinicio de la fase de una oscilación. **A.** Ejemplo del cálculo de la onda promedio (rojo) a partir de los tramos de LFP (grises) alineados al pulso eléctrico (línea discontinua). **B.** Alteración de la transición natural de las fases de una oscilación en presencia de un estímulo.

espectrograma wavelet del mismo. Se determinó la frecuencia theta dominante a partir del espectrograma wavelet. Los segmentos peri-estímulo fueron filtrados de nuevo a la frecuencia dominante ± 2 Hz. Se volvió a calcular la oscilación promedio a partir de los segmentos filtrados para determinar la potencia theta pre- y post-estímulo. Para determinar el incremento de actividad theta tras el pulso eléctrico, se calculó la ratio entre las potencias post y pre-estimulación.

El reinicio de la fase se da cuando se produce una alteración de la componente temporal en un oscilador dinámico (figura 13 B). En los circuitos neuronales, el reinicio de la fase de una oscilación se da ante la presencia de un *input* que cambie el patrón de disparo de las neuronas y, como consecuencia, de su oscilación generada. Para estudiar este reinicio se calculó la fase instantánea, de los segmentos LFP peri-estímulo del hipocampo, mediante la transformada de Hilbert. Brevemente, la transforma-

da de Hilbert es un operador lineal de convolución que permite obtener la función analítica $f_a(t)$ de una función real $f(t)$ como:

$$f_a(t) = f(t) + i\hat{f}(t)$$

donde $\hat{f}(t)$ es la transformada Hilbert de la función $f(t)$. Así, los valores de fase pueden obtenerse a partir de la parte imaginaria de la representación analítica de la serie temporal real $f(t)$.

La extracción de las fases permitió observar si la banda theta presentó reinicio en respuesta a la activación eléctrica del NI. Para ello, se calcularon los valores del estadístico del test de Rayleigh para determinar la uniformidad de las fases en cada tiempo de la ventana periestímulo. Posteriormente, el p -valor de dicho test se representó en función del tiempo, permitiéndonos detectar el tiempo de reinicio cómo el tiempo en el que el p -valor disminuye del umbral 0.05 y se mantiene significativo, al menos, durante un ciclo theta completo.

Para las comparaciones de la potencia theta pre- y post-estímulo se empleó una prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras emparejadas. Todos los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

La integración de áreas distribuidas en el sistema nervioso resulta difícil de evaluar. Un enfoque que puede caracterizar esta integración nerviosa es en términos de «*conectividad funcional*», es decir, la existencia de correlaciones entre las medidas de actividad neuronal. La conectividad funcional se define como la dependencia estadística entre eventos neurales generados en poblaciones neuronales diferentes. Señales bioeléctricas diferentes pueden conllevar correlaciones entre sí que indiquen la presencia de actividad sincrónica, fruto de la existencia de un procesamiento común que integre información entre ellas. Sin embargo, la integración neural dentro de un sistema distribuido es mejor entendida en términos de «*conectividad efectiva*», o influencia que un sistema neural ejerce sobre otro. La distinción entre conectividad funcional y efectiva es importante porque determina la naturaleza de las inferencias hechas sobre la integración funcional y los tipos de preguntas que se pueden abordar.

La descripción de los resultados se adapta al planteamiento descrito en las hipótesis y objetivos del trabajo. En una primera aproximación nos centramos en el estudio de la conectividad efectiva que se da entre el núcleo incertus y el hipocampo, a tenor de los datos previos que describen la influencia del núcleo incertus en la red responsable de la ritmicidad theta hipocámpica. En un segundo enfoque, abordamos el estudio de la actividad unitaria de las neuronas del núcleo incertus en relación con la oscilación theta del hipocampo. Además, a partir de estos resultados hacemos un intento de inferir relaciones causales entre la actividad individual de las neuronas y la ritmicidad poblacional del hipocampo que ahonde en la conectividad efectiva entre poblaciones particulares del núcleo incertus y el sistema septohipocámpico. Por último, estudiamos el efecto que la activación del núcleo incertus tiene sobre la temporalidad del ritmo theta hipocámpico.

4.1 EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DE LA CONECTIVIDAD EFECTIVA ENTRE EL NÚCLEO INCERTUS Y EL HIPOCAMPO

De acuerdo con estudios previos de nuestro propio grupo, el sistema de proyecciones ascendentes del NI lo capacitan para ocupar un papel relevante en la activación de la oscilación theta del hipocampo (Olucha-Bordonau et al., 2003). Su estimulación eléctrica confirmó esta idea (Núñez et al., 2006), pero además, en un estudio reciente se determinó que el hipocampo y el NI presentan una actividad local sincrónica y acoplada a las frecuencias theta (Cervera-Ferri et al., 2011). En el presente trabajo se intenta ahondar en los detalles de este acoplamiento, dilucidando, en último término, la direccionalidad del mismo. Para ello, y como una primera aproximación, se realizaron registros del potencial de campo eléctrico en NI e hipocampo, en un modelo experimental de animal anestesiado con uretano, bajo la presencia sostenida de actividad theta hipocámpica mediada por la estimulación química con el agonista colinérgico carbacol.

4.1.1 *La activación colinérgica del núcleo incertus evoca una actividad theta mantenida en el hipocampo*

Dado que RPO ha sido considerado el principal generador troncoencefálico de ritmicidad theta en el hipocampo y que además resulta ser colinoceptivo, en estos experimentos se utilizó su estimulación mediante la infusión intracerebral de carbacol, clásico agonista colinérgico. Únicamente los ejemplares en los que el análisis histológico reveló el correcto posicionamiento de los electrodos de registro y del capilar de infusión se incluyeron en el estudio ($n = 10$). La amplitud de la oscilación theta registrada en NI no mostró correlación lineal con la amplitud de la onda theta registrada en hipocampo ($r^2 = 0.18 \pm 0.03$), siendo éste un indicador de que la conducción volumétrica contribuye de forma marginal al theta observado en estas dos áreas.

En condiciones basales, tanto el hipocampo como NI mostraron una dominancia de ondas delta de gran amplitud con poca presencia de actividad theta. Tras este periodo basal, se realizó una micro-infusión de carbacol en RPO ($1 \mu\text{l min}^{-1}$) a los 120 s. Al igual que en trabajos anteriores (Cervera-Ferri et al., 2011), este tipo de estimulación produjo un incremento sostenido de la actividad theta, reduciendo la presencia de ondas delta en ambos núcleos (figura 14). La inyección de suero salino en RPO en los registros control no llevó a cambios significativos en la actividad de campo de NI o hipocampo (figura 14C).

Los espectrogramas wavelet en el dominio tiempo-frecuencia y los espectrogramas cruzados de las señales originales pueden

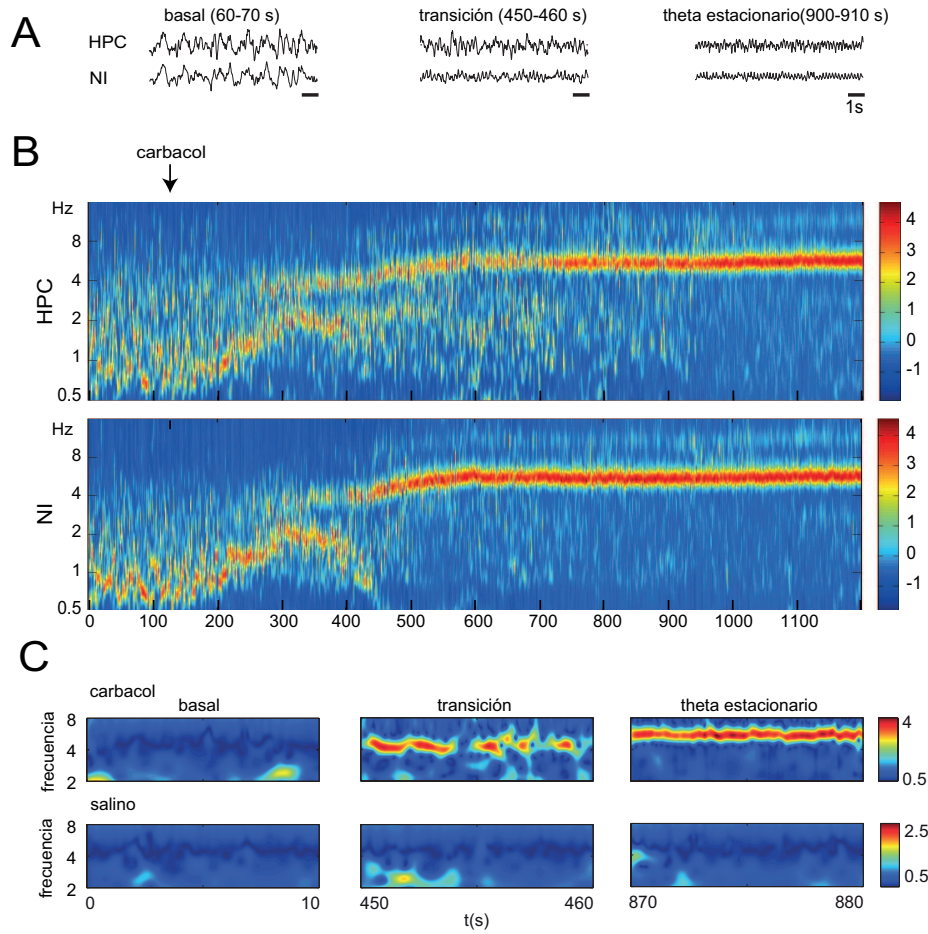


Figura 14: Análisis tiempo-frecuencia de los potenciales de campo local de hipocampo y núcleo incertus tras el efecto de la infusión de carbacol. **A.** Caso representativo de los registros LFP en condiciones basales, durante el periodo de transición y en el periodo de theta estacionario. **B.** Espectrogramas wavelet (descomposición tiempo-frecuencia) con energías normalizadas, donde los colores cálidos del código de color indican mayor potencia de los coeficientes wavelet a un tiempo y frecuencia dados. Flecha negra: inicio de la micro-infusión de carbacol. Ambos paneles muestran espectrogramas completos representativos con un patrón oscilatorio similar tanto en NI como en hipocampo. Durante el efecto del carbacol, la distribución de los componentes espectrales cambió drásticamente en ambos LFP, concentrando su energía en la banda theta. **C.** El espectrograma cruzado de los segmentos seleccionados como periodos basal, transición y theta estacionario. Los colores cálidos indican la coexistencia de patrones oscilatorios similares en el mismo tiempo y frecuencia. Las zonas de concurrencia se observan con el efecto del carbacol (arriba), indicando correlación entre ambas señales. Las inyecciones de salino (abajo) mostraron un comportamiento similar al basal en todos los casos.

observarse en la figura 14 como caso representativo. En el periodo basal, ambos núcleos mostraron una actividad oscilatoria irregular de gran amplitud y frecuencias lentas, entre 0.5 y 3 Hz. Durante estos tramos basales, si bien fue posible detectar tramos de ondas theta espontáneas, la potencia relativa de las frecuencias theta fue siempre inferior al umbral de significación. La detección de regiones en el espectrograma con potencia máxima en banda theta de los periodos basales reveló, en ambos núcleos, la presencia de fragmentos de theta espontáneo ($1.60 \pm 0.60\%$ en hipocampo y $2.17 \pm 1.70\%$ en NI) aislados de las oscilaciones delta, con una frecuencia promedio entre 3 y 4 Hz.

Tras la infusión de carbacol en RPO pudo observarse en el hipocampo un efecto de transición, donde la actividad irregular de oscilaciones lentas (por debajo de 3 Hz) cambió a actividad predominante theta, con una banda muy marcada alrededor de 4 Hz. Durante este periodo transitorio, la ritmicidad theta en ambas áreas surgió de forma intermitente (figura 15A). La proporción media de segmentos con potencia máxima en banda theta durante este periodo fue del $20.27 \pm 8.50\%$ para el hipocampo y de $44.12 \pm 19.04\%$ para NI.

El efecto máximo de la estimulación de RPO se observó varios minutos tras la infusión de carbacol. La proporción de ondas theta incrementó progresivamente hasta alcanzar valores máximos en ambas áreas. En conjunto, la banda theta mostró un comportamiento asintótico estable, referido en el presente trabajo como periodo theta estacionario. En este periodo, los segmentos theta se hicieron más frecuentes en el registro, obteniendo valores más elevados, con una presencia del $69.65 \pm 19.54\%$ para el hipocampo y del $80.45 \pm 10.55\%$ en para NI. El espectrograma cruzado wavelet, mostrado en la figura 14C, permite visualizar la similitud en la distribución de frecuencias en ambos canales tras la activación colinérgica. Este efecto no se observó con la inyección control de suero salino.

Con un umbral de detección basado en el último cuartil (por encima del 75 %), se detectaron tanto las interrupciones en la ritmicidad theta como los descensos de potencia, normalmente a favor de las frecuencias lentas. Se encontraron interrupciones irregulares de la actividad theta en ambos registros LFP durante el periodo theta estacionario. En todos los experimentos, el efecto del carbacol llevó a NI a mostrar un espectrograma con una oscilación theta constante de alta potencia, mientras que la oscilación de hipocampo fue mas discontinua, presentando pequeños segmentos de theta de menor potencia, combinados con segmentos de ondas lentas.

Se observó que NI parece mostrar un patrón de ritmicidad theta estacionaria con una latencia inferior respecto a hipocam-

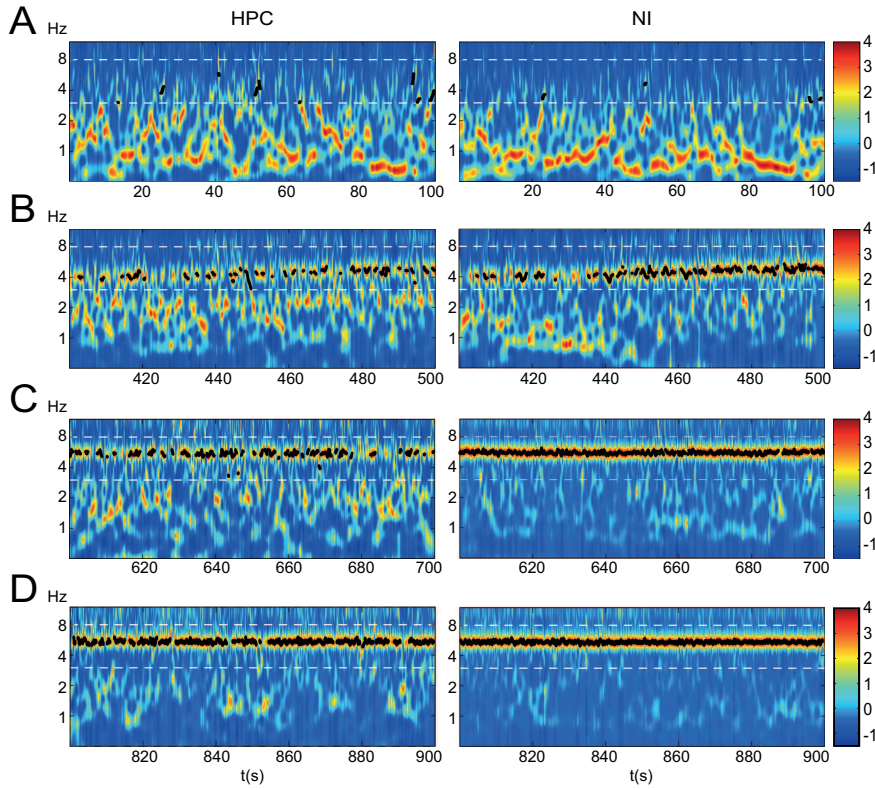


Figura 15: Medida temporal de la actividad theta. Los puntos negros marcan la potencia local máxima en banda theta en los espectrogramas (3 a 8 Hz delimitados con líneas punteadas). En este caso representativo el periodo basal (**A**) muestra segmentos cortos de theta espontáneo en una proporción mínima en ambos núcleos, hipocampo (proporción = 4.31 %; frecuencia media = 3.86 ± 0.68 Hz) y NI (proporción = 1.84 %; frecuencia media = 3.48 ± 0.47 Hz). Durante el periodo de transición (**B**), ambos canales incrementaron gradualmente el theta máximo. Sin embargo, la proporción en hipocampo (proporción = 24.23 %; frecuencia media = 4.35 ± 0.38 Hz) mostró una estabilización mas lenta, en frecuencias theta, que lo registrado en NI (proporción = 46 %; frecuencia media = 4.45 ± 0.35 Hz). Como evidencia el periodo theta estacionario (**C**), mientras el NI refuerza un estado constante en theta (proporción = 92.3 %; frecuencia media = 5.54 ± 0.16 Hz), el hipocampo exhibió predominancia de segmentos theta, coexistiendo con pequeñas etapas de ondas lentas (proporción = 34 %; frecuencia media = 5.49 ± 0.29 Hz). Conforme pasó el tiempo (**D**), la presencia de oscilaciones theta hipocámpicas se incrementaron (proporción = 64.82 %; frecuencia media = 5.42 ± 0.17 Hz). En este segmento, el NI mantuvo los mayores valores de actividad theta (proporción = 93.26 %; frecuencia media = 5.43 ± 0.12 Hz).

po. El efecto más marcado tras la micro-infusión de carbacol se reflejó en un rápido incremento de la energía normalizada de la banda theta en ambos LFPs. Sin embargo, la oscilación de NI mostró una estabilización significativamente más temprana a frecuencias superiores a 3 Hz (a los 4.9 ± 1.2 min) frente al hipocampo (a los 7.8 ± 2.0 min), con un retraso de 3.0 ± 0.9 min (Test de Wilcoxon, $Z = 2.20$, $p < 0.05$).

4.1.2 *Las actividades del núcleo incertus y el hipocampo incrementan su sincronización tras la infusión de carbacol*

Como muestra la figura 16, el análisis de la coherencia wavelet confirmó la presencia de una actividad altamente acoplada bajo el efecto del carbacol. Se analizó la coherencia en la oscilación theta entre ambas estructuras, en seis periodos consecutivos de diez segundos, al principio del registro y al inicio del periodo theta estacionario. En la figura 16 (A y B) puede observarse la coherencia wavelet en el dominio tiempo-frecuencia y la máxima coherencia en la banda theta. El máximo de coherencia fue de 0.59 ± 0.04 en el periodo control, aumentando hasta 0.97 ± 0.01 durante el periodo theta estacionario. En los experimentos de infusión de suero salino, la coherencia control fue de 0.52 ± 0.04 y de 0.61 ± 0.05 tras la inyección. Estos datos confirman resultados previos de nuestro grupo (Cervera-Ferri et al., 2011), afirmando que los valores de coherencia aumentan entre hipocampo y NI bajo condiciones de estimulación colinérgica (Test de Wilcoxon, $Z = 3.72$, $p < 0.01$), mientras que no se produce tal cambio con la inyección salina ($Z = 17.28$, $p > 0.05$).

4.1.3 *El carbacol produce un acoplamiento de fases progresivo entre el hipocampo y el núcleo incertus*

Ante el efecto colinérgico, se pudo observar un cambio en las fases de la oscilación theta, como proporciona la información referente al sentido de los vectores de las fases extraídas del coherograma wavelet (figura 17A). Un ejemplo del cambio de fases puede observarse en la figura 17B. Se analizó la evolución temporal de las diferencias de fases y los valores de PLV como forma de detectar el patrón de acoplamiento temporal entre los núcleos (figura 18A y B; tabla 3). Tanto los valores de diferencias de fase como el PLV mostraron gran variabilidad durante el periodo basal, no siendo así durante el periodo theta estacionario, el cual mostró una bajada en la variabilidad de estos datos.

En la situación basal, en todos los casos, la distribución de ángulos de las diferencias de fases no fue aleatoria (Test de Rayleigh, $p < 0.01$), sugiriendo la existencia de una preferencia de

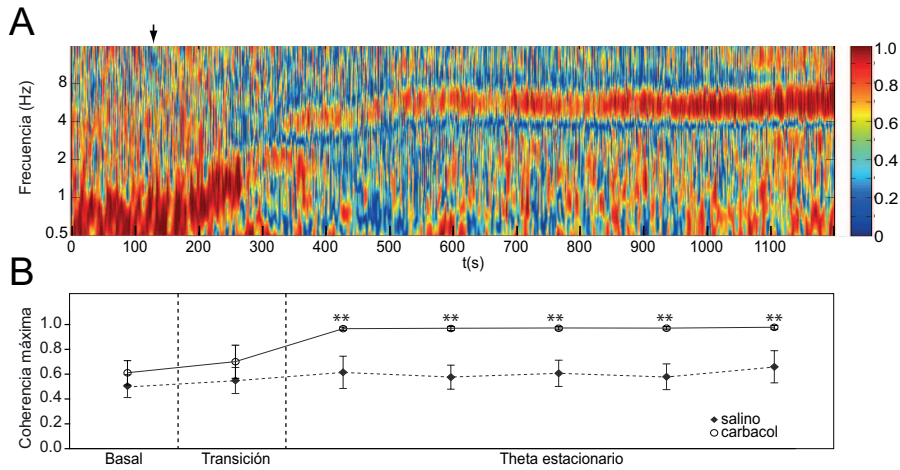


Figura 16: Análisis de coherencia wavelet. **A.** Análisis de la coherencia tiempo-frecuencia para un caso representativo. En las condiciones control se encontró alta coherencia a frecuencias lentas. Tras la infusión de carbacol (flecha negra), la coherencia wavelet incrementó progresivamente a frecuencias mas altas dentro de las ondas delta (sobre los 300 s). Tras el periodo de transición, la coherencia cambió a una densa banda a frecuencias theta. **B.** Evolución temporal de la coherencia máxima encontrada en la banda theta. La inyección de carbacol indujo el incremento de la coherencia theta, alcanzando valores cercanos a 1, siendo ausente tras la inyección de salino. Barras de error: media \pm error estándar de la media

fase a frecuencias theta ($PLV = 0.48 \pm 0.04$), incluso bajo condiciones espontáneas, con un ángulo medio de 0.71 ± 4.98 grados. Tras la administración de la droga, las diferencias de fases en la banda theta cambiaron a valores negativos. En el algoritmo de cálculo implementado, los ángulos negativos son indicativos de un avance temporal en la oscilación de NI respecto a la de hipocampo. Durante el periodo de transición, el ángulo medio cambió a -73.25 ± 17.85 grados (Test de Rayleigh, $p < 0.01$), mostrando mayor variabilidad ($PLV = 0.50 \pm 0.05$).

Durante el periodo de theta estacionario, las diferencias de fase cambiaron a -130.73 ± 12.65 grados (Test de Rayleigh, $p < 0.01$) y las oscilaciones mostraron un fuerte acoplamiento durante el primer minuto de esta fase ($PLV = 0.94 \pm 0.004$), manteniéndose en valores similares durante los cinco minutos de periodo theta estacionario, con muy poca variabilidad inter-sujeto. El cambio a la fase negativa indica la posibilidad de la anticipación de NI en la oscilación theta registrada.

Los análisis de Friedman para cada parámetro, con comparaciones por parejas, confirmaron las diferencias entre el periodo basal y theta estacionario. La comparación de los ángulos medios fue de $\chi^2(6) = 86.88$, con $p < 0.01$; y el valor de acopla-

Tabla 3: Parámetros de acoplamiento de fases entre las oscilaciones theta de NI e hipocampo para los periodos basal, transición y theta estacionario (Theta).

Periodo	Ángulo de fase	Acoplamiento de fase
Basal	0.71 ± 29.86	0.48 ± 0.22
Transición	$-73.25 \pm 107.08^{**}$	0.50 ± 0.28
Theta 0 a 60 s	$-130.73 \pm 75.89^{**}$	$0.94 \pm 0.02^{**}$
Theta 60 a 120 s	$-146.60 \pm 10.49^{**}$	$0.94 \pm 0.03^{**}$
Theta 120 a 180 s	$-139.11 \pm 11.86^{**}$	$0.94 \pm 0.04^{**}$
Theta 180 a 240 s	$-130.80 \pm 18.00^{**}$	$0.94 \pm 0.03^{**}$
Theta 240 a 300 s	$-125.31 \pm 20.44^{**}$	$0.94 \pm 0.04^{**}$

(**) $p < 0.01$

miento de fase obtuvo un estadístico de $\chi^2(6) = 122.52$, con $p < 0.01$.

4.1.4 *La presencia de oscilaciones mantenidas en hipocampo permite demostrar la conectividad efectiva entre el propio hipocampo y el núcleo incertus*

El establecimiento de actividades sincrónicas tal y como han sido descritas habla de la existencia de una conectividad funcional entre las dos áreas nerviosas, demostrando así la interdependencia estadística entre las señales temporales que generan. Los datos demuestran la sincronización en la banda de frecuencias theta entre NI e hipocampo, con una estabilización más temprana en NI. Estos resultados nos llevan a plantear cuál es el flujo de información neto, en el sentido NI hacia hipocampo (NI→HPC) o hipocampo hacia NI (HPC→NI). Así pues, nuestra intención fue definir las interacciones causales («flujo de información») entre las actividades poblacionales del núcleo incertus y el hipocampo. Para llevar a cabo este propósito, se aplicaron análisis de las series temporales en los que se estudiaba la causalidad de Granger para determinar la direccionalidad entre ambas áreas en situaciones de alta coherencia. Una primera aproximación se abordó con el cálculo de la causalidad en ventanas temporales de 20 s, visualizando así las relaciones causales entre ambas señales en el dominio de la frecuencia (figura 19A). Cuando están presentes, los picos de causalidad en uno de los dos sentidos implican un flujo neto de información entre ambas señales.

Los promedios de los valores espectrales de causalidad reflejaron las diferentes tendencias causales en cada condición expe-

rimental. En condiciones espontáneas (periodo basal) no se encontraron picos de causalidad en ninguna dirección (figura 19B izquierda). El efecto colinomimético indujo interacciones causales significativas, detectadas como flujos asimétricos en ambas direcciones en la banda theta (figura 19B derecha). Durante el periodo de transición pudo observarse una tendencia al cambio en la relación causal de hipocampo y NI (figura 19B centro).

La progresión tiempo-frecuencia de la causalidad en ambas direcciones, para un caso representativo, se muestra en la figura 19C. Las diferencias entre los valores de causalidad, calculados

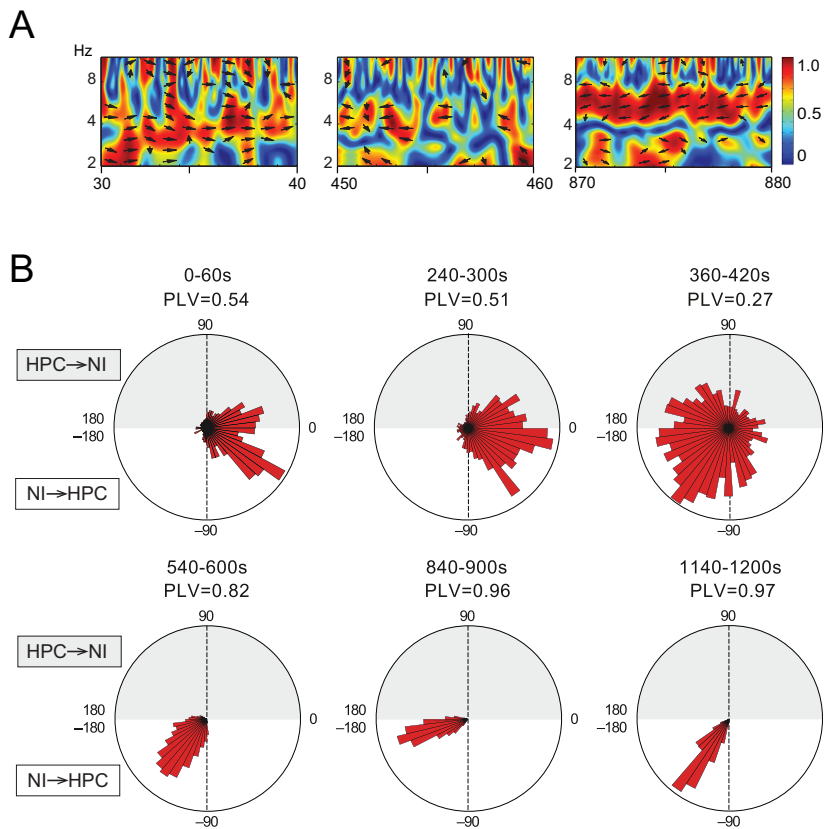


Figura 17: Caso representativo de la evolución de las fases en theta. **A.** Detalle del análisis tiempo-frecuencia de la coherencia donde puede observarse el cambio de fases. En condiciones control, segmentos cortos con valores de coherencia elevados mostraron flechas hacia la derecha, indicando diferencias de fase positivas próximas a 0 grados. Con el efecto colinérgico, las flechas de las fases mostraron valores negativos, indicando la posibilidad de un liderazgo predominante de NI en la oscilación theta común. **B.** Distribución de la evolución de los valores de fases, representados en diagramas de rosa. El valor de acoplamiento de fase se presenta como una medida del grado de acoplamiento entre ambos LFP. Aunque todos los diagramas reflejan preferencia de fase (Test de Rayleigh, $p < 0.01$), los PLV demostraron un cambio progresivo hacia valores negativos, próximos al patrón de anti-fase.

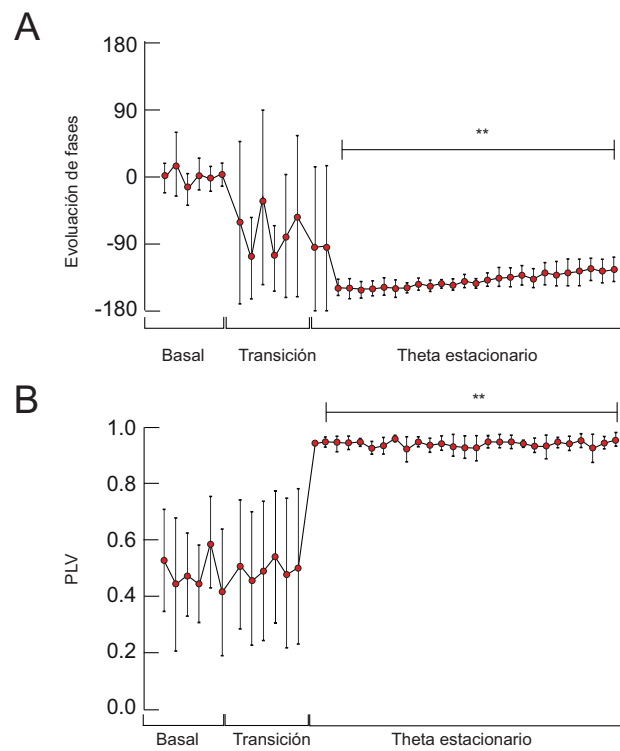


Figura 18: Evolución temporal de las fases de la oscilación theta. **A.** Progresión temporal de los valores de desplazamiento de fase. **B.** Progresión temporal de los PLV. Nótese la remarcable baja variabilidad, en ambos casos, durante el periodo theta estacionario.

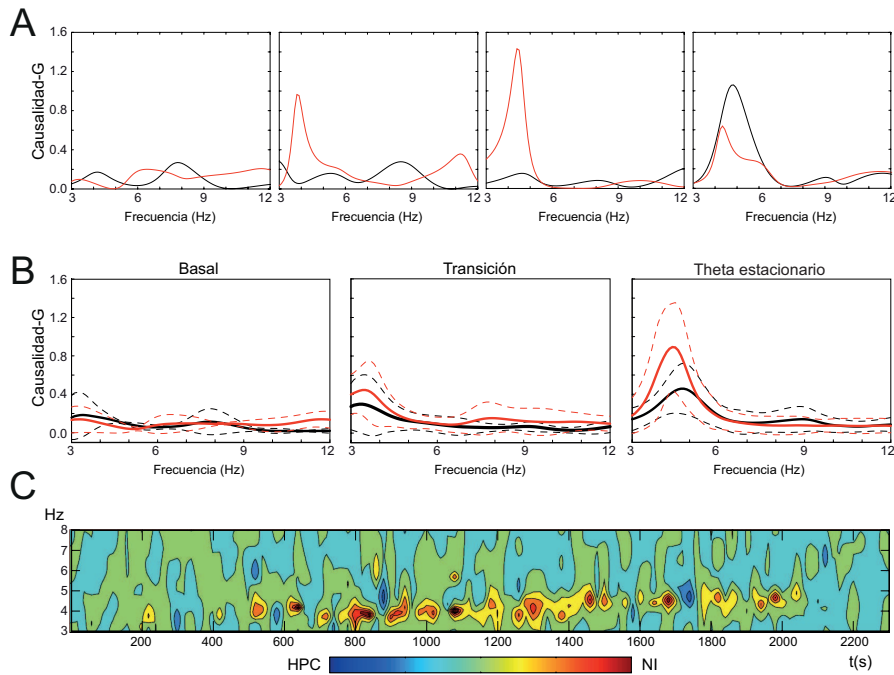


Figura 19: Interacciones causales entre las oscilaciones de hipocampo (líneas negras) y NI (líneas rojas). **A.** Diferentes relaciones causales de Granger encontradas entre los registros de campo de hipocampo y NI en la banda theta. **B.** Causalidad-G espectral promedio de los tres posibles escenarios. Notar la predominancia de la direccionalidad NI→HPC durante el periodo theta estacionario. **C.** Representación temporal de las dinámicas de la causalidad-G calculadas para segmentos de 20 s para ambas direccionalidades. El gráfico de contornos tiempo-frecuencia representa las diferencias entre las dos direccionalidades (rojo para NI→HPC y azul para HPC→NI).

en ambas direcciones y restringidos a la banda theta, se encuentran representadas como una gradación de color en el gráfico de contornos. La mayoría de las regiones de causalidad significativa se concentran en una banda ajustada a la frecuencia dominante de 4 Hz. Durante los periodos theta, predominó claramente la direccionalidad de NI hacia el hipocampo (NI→HPC; tonos rojos), interrumpida por cortos segmentos de direccionalidad inversa (HPC→NI; tonos azules).

En la figura 20 se representa la distribución de la causalidad en los distintos periodos para las frecuencias con máxima coherencia para cada condición experimental. Los estadísticos Chi-cuadrado indicaron diferencias en la direccionalidad de la oscilación theta debidas a la activación colinérgica del hipocampo. Durante el periodo basal, algunos casos mostraron causalidad NI→HPC (48.0 %) o causalidad HPC→NI (8.0 %), mientras que el 44.0 % no presentaron direccionalidad. Esta distri-

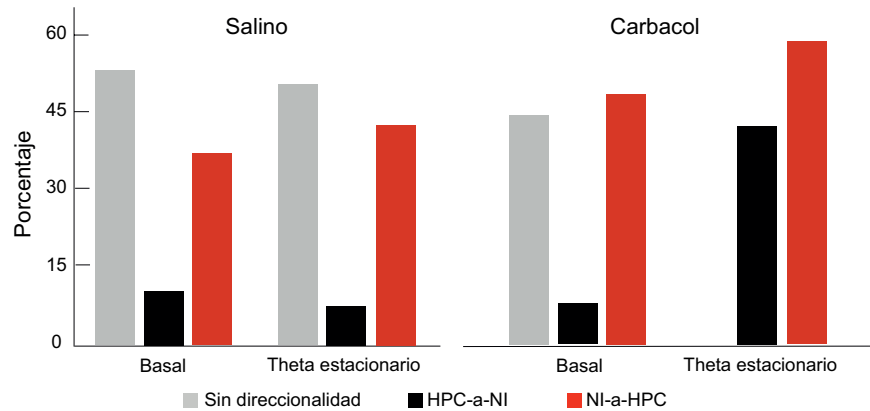


Figura 20: Relación causal entre hipocampo y NI. Porcentaje de las interacciones causales entre ambas señales en segmentos de 20 s, clasificados según los distintos periodos (basal, transición, theta estacionario). La causalidad está calculada para la frecuencia con coherencia máxima. Rojo para NI→HPC y negro para HPC→NI.

bución es similar a la de los periodos control tras la infusión de salino ($\chi^2(2) = 0.297, p > 0.05$). Un cambio significativo y gradual en la direccionalidad de ambas series temporales se observó durante el periodo theta estacionario: 0.0 % periodos no direccionales, 41.9 % con direccionalidad HPC→NI y 58.1 % con direccionalidad NI→HPC. Esta distribución de causalidad difirió significativamente de la registrada en el periodo basal ($\chi^2(2) = 124.632, p < 0.01$), con un incremento sustancial en la direccionalidad HPC→NI y la completa desaparición de los segmentos sin direccionalidad neta. Aunque el incremento de direccionalidad NI→HPC fue sutil, se registró un liderazgo predominante de NI sobre hipocampo tanto en condiciones espontáneas como bajo el efecto colinérgico sostenido. Tras el máximo efecto del carbacol se observa un marcado incremento de la direccionalidad HPC→NI, aun con predominancia de momentos con direccionalidad NI→HPC.

En resumen, el núcleo incertus presenta una estabilización oscilatoria a frecuencia theta más temprana que el hipocampo en condiciones de activación colinérgica. Además, esta actividad theta sincrónica parece transmitirse, mayoritariamente, desde NI hacia el hipocampo, tal y como demuestra el análisis de causalidad de Granger. Estos resultados ponen de manifiesto el papel del núcleo incertus en la red encargada de la generación y mantenimiento de la actividad theta hipocámpica tras una activación del sistema colinérgico.

4.2 EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL NÚCLEO INCERTUS EN PRESENCIA DE RITMICIDAD THETA HIPOCÁMPICA

En el experimento 1 se evidencia la presencia de una *conectividad efectiva* en los momentos de coherencias elevadas entre el núcleo incertus y el hipocampo, que coinciden con periodos de activación theta en ambas estructuras. Los datos sugieren flujos de información en ambos sentidos, lo que lleva a pensar que existe un *feedback* entre las dos áreas. Aun así, las medidas de causalidad derivadas de las señales LFP no son del todo concluyentes, ya que aun habiendo un predominio de la direccionalidad NI→HPC, la contraria tiene una presencia muy considerable, sin acabar de discernir las condiciones en las que ambos flujos tienen lugar. Consideramos aquí el estudio de la sincronización del hipocampo con la actividad de las diferentes poblaciones neuronales del núcleo incertus mediante el registro unitario de sus neuronas.

En trabajos previos se caracterizó la actividad de las neuronas del NI. En estos primeros resultados se evidenció la coexistencia de dos poblaciones neuronales que podían diferenciarse por su patrón de disparo: neuronas no rítmicas a frecuencias theta, nombradas como neuronas tipo I; y neuronas rítmicas a frecuencias rápidas o neuronas tipo II (Núñez et al., 2006). Ambas poblaciones neuronales no explican la presencia de una actividad oscilatoria a frecuencias theta en el núcleo incertus. Por tanto, nuestra intención fue determinar si la oscilación theta registrada en NI provenía de la actividad rítmica de sus neuronas, y con ello caracterizar el sustrato neuronal responsable de las ondas theta de NI, o si por el contrario, la actividad oscilatoria provenía de un oscilador externo.

La primera hipótesis que planteamos fue, por tanto, que la ritmicidad theta de NI provendría de un patrón rítmico de al menos un grupo de sus neuronas y que, además, este perfil de disparos debería mantenerse en el tiempo, compatible con la presencia de actividad oscilatoria poblacional en la banda de frecuencias theta. Así, planteamos el uso de una estimulación sostenida, con el fin de provocar una respuesta fisiológica similar a los períodos de actividad theta encontrados en el hipocampo.

Mientras que en el trabajo de Núñez et al. (2006) la caracterización electrofisiológica de las neuronas de NI se llevó a cabo realizando estimulaciones eléctricas en RPO, con 500 ms de duración, en este experimento se realizaron estimulaciones eléctricas largas, así como estimulación sensorial mantenida. No se planteó la activación neuroquímica colinérgica del experimento 1 para poder observar repetidamente los cambios en la actividad

neuronal ante la presencia de estímulos y la eliminación de los mismos.

En resumen, se registró la actividad neuronal, bajo condiciones de anestesia, con un protocolo de estimulación diseñado para generar una oscilación theta mantenida en el tiempo. Para este fin, se emplearon dos tipos de estimulaciones: estimulaciones eléctricas largas de más de 5 s y estimulación sensorial mediante pinzamiento de la cola (30 s). Adicionalmente, se analizaron periodos de theta espontáneo de más de 5 s. Posteriormente se estudió si la actividad neuronal emergente bajo estas condiciones se encontraba acoplada al theta hipocámpico. Fueron registradas un total de 97 neuronas a partir de 38 animales. Los registros en los que no se observó un efecto significativo de la estimulación o aquellos en los que el análisis histológico confirmó el mal emplazamiento de los electrodos fueron descartados ($n = 10$), dejando un total de 87 neuronas válidas. El posicionamiento de los electrodos, así como los lugares de registros, pueden observarse en la figura 21. Todos los resultados presentados a continuación están expresados como media \pm error estándar de la media.

4.2.1 *En condiciones basales se identifican los dos tipos de neuronas descritas en el núcleo incertus*

En estos experimentos, bajo condiciones de anestesia con uretano, el registro extracelular de hipocampo presentó dominancia de ondas delta en hipocampo (<3 Hz), con breves apariciones de periodos theta espontáneos, la duración de los cuales dependía del nivel de anestesia del animal, controlado mediante la monitorización continua de la proporción de potencia delta (0 a 3 Hz) respecto al total de frecuencias registradas (0 a 30 Hz), y manteniéndola siempre en valores superiores al 60 %. No obstante, los registros variaron entre periodos de dominancia delta con incursiones de oscilación theta espontánea (figura 22B).

Mediante este modelo experimental, la actividad theta hipocámpica, en animal anestesiado sin manipulación, fue de 31.87 ± 1.30 %. En este estado basal se encontraron neuronas tipo I con una tasa de disparo de 4.66 ± 1.13 espigas/s, presentando una distribución no rítmica, y neuronas tipo II, con disparos aparentemente mas regulares a una tasa de disparo de 12.71 ± 2.57 espigas/s.

4.2.2 *Los diferentes paradigmas de estimulación permiten evidenciar un nuevo grupo neuronal en el núcleo incertus*

La pretensión del presente trabajo fue la de estudiar la actividad de las neuronas del NI en condiciones de activación theta

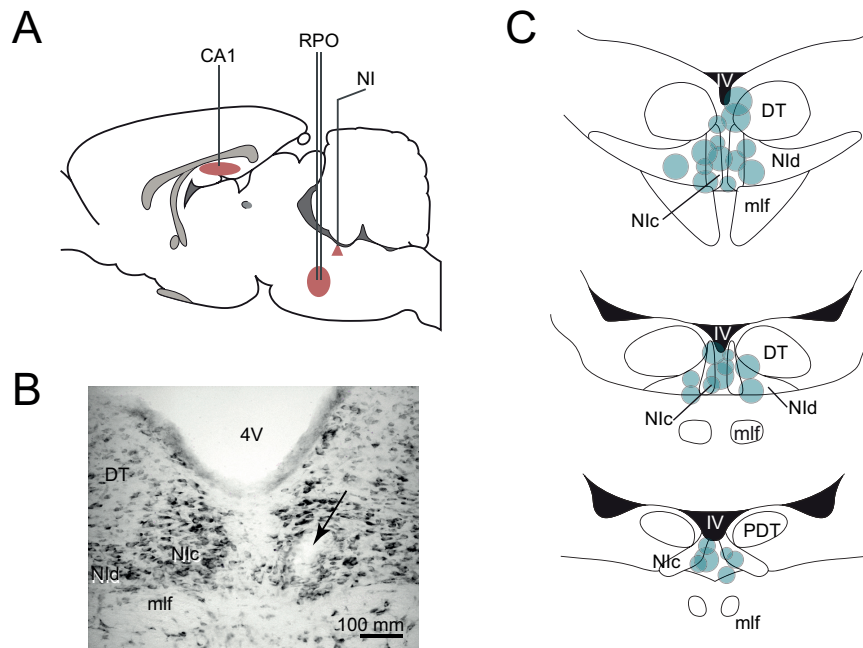


Figura 21: Localización de los electrodos de registro y estimulación. **A.** Representación esquemática de los lugares de registro y estimulación. **B.** Verificación histológica de la posición del electrodo de registro unitario. Nótese la lesión producida por la punta del electrodo en la parte central de Nlc, señalado con una flecha. **C.** Esquema de los lugares de registro en NI a lo largo de distintos niveles rostro-caudales. 4V, cuarto ventrículo; CA1, cornnus Ammonis; DT, núcleo del tegmento dorsal; mlf, fascículo longitudinal medial; NId, núcleo incertus *pars dissipata*; Nlc, núcleo incertus *pars compacta*; PDT, núcleo tegmental posterodorsal; RPO, núcleo reticular pontino oral.

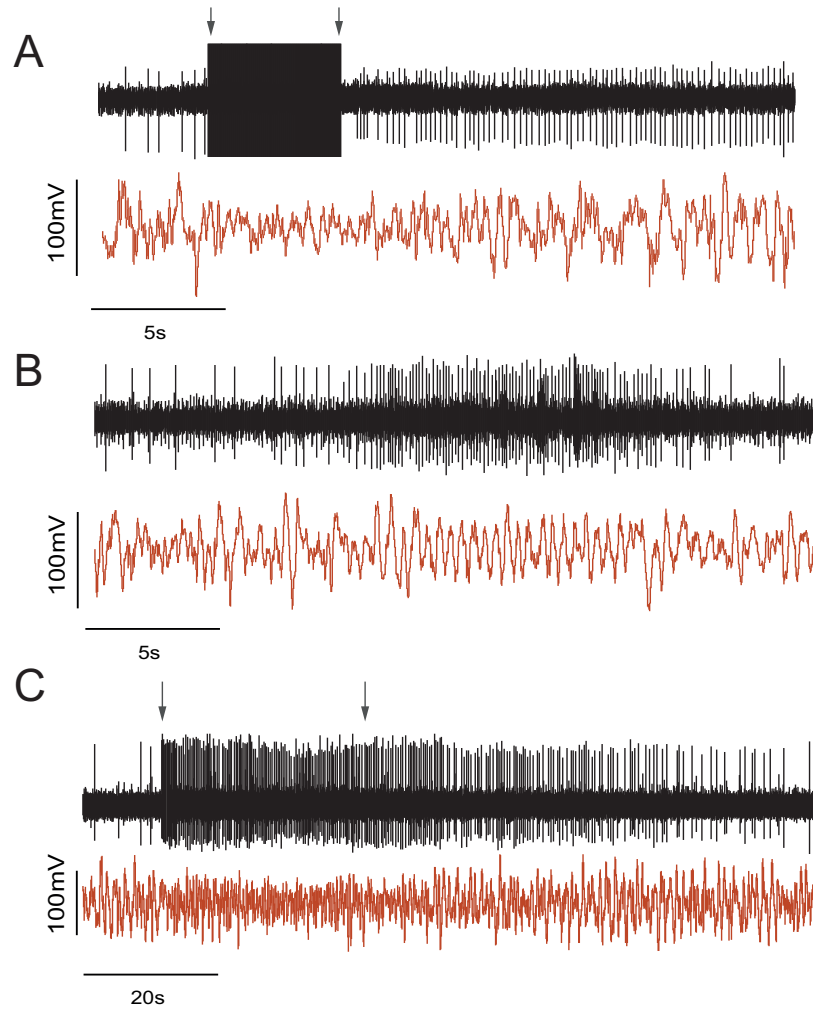


Figura 22: Registros en crudo de neuronas tipo III y el LFP de hipocampo. **A.** La estimulación eléctrica de larga duración en RPO hace visible la actividad de las neuronas tipo III, las cuales adquieren disparo regular en banda theta. El artefacto del estímulo eléctrico se muestra como una región negra, acotada por flechas. **B.** Actividad unitaria regular espontánea en banda theta de una neurona tipo III, acompañada de aparición de actividad theta en el LFP de hipocampo. **C.** El *tail pinch* (delimitado por flechas) induce actividad rítmica en las neuronas tipo III. El cese del estímulo conlleva el descenso gradual de la tasa de disparo de las neuronas así como la desaparición de la actividad theta en hipocampo. Nótese el cambio de escala temporal.

hipocámpica reversible de larga duración. Para ello, se emplearon trenes largos de estimulación eléctrica (5 s, 100 Hz, pulsos de 0.3 ms) y periodos de estimulación sensorial, *tail pinch*, de 30 s de duración.

En estas condiciones, la actividad theta del hipocampo ante los estímulos sensoriales pasó del $31.87 \pm 1.30\%$ hasta el $48.68 \pm 1.30\%$ tras el *tail pinch* ($Z = -6.529$, $p < 0.01$). El cese de la estimulación supuso un descenso de la actividad theta hasta un $34.85 \pm 2.05\%$, ligeramente superior a la potencia basal ($Z = -2.253$, $p < 0.05$). Esta primera valoración de los cambios de la presencia de ritmicidad theta nos llevaron a intuir que podrían existir transiciones, más o menos cortas, en los primeros tramos tras la estimulación y con la finalización de la misma. Así, la evolución temporal de la potencia theta se analizó en ventanas de 10 s. Curiosamente, durante los primeros 10 s del *tail pinch* se obtuvieron los valores más elevados de potencia theta ($49.53 \pm 2.15\%$).

También es interesante observar como la vuelta a los valores basales presenta cierta latencia. Los primeros 10 s del periodo post-estimulación mostraron una actividad theta del $38.02 \pm 2.36\%$, significativamente inferior a la encontrada durante la estimulación, pero ligeramente superior a los valores basales (post *vs.* basal, $Z = -2.926$, $p < 0.01$; post *vs.* estimulación, $Z = -6.271$, $p < 0.01$). Finalmente, a los 20 s tras el cese de la estimulación, la actividad theta volvió a niveles basales ($Z = -1.342$, $p > 0.05$). Así pues, la presencia de oscilaciones theta se atenúa progresivamente, tras el cese del estímulo, hasta valores comparables con los del periodo basal. De esta forma, pusimos de manifiesto la validez del *tail pinch* como método de evocación transitoria de actividad theta hipocámpica, condición indispensable para la caracterización de las neuronas del NI.

La activación theta de larga duración permitió reconocer un grupo neuronal con una tasa de disparo irregular a frecuencias ligeramente superiores a theta (neuronas tipo I) y un segundo grupo de neuronas con disparo rápido y actividad regular (neuronas tipo II). Adicionalmente, la activación de larga duración evidenció un tercer grupo neuronal no descrito hasta el momento. Estas neuronas fueron nombradas como tipo III, y presentaban una tasa de disparo regular en el rango theta durante los periodos de actividad theta evocada en hipocampo. La detección de este tipo neuronal en los periodos activos de hipocampo nos permitió determinar sus propiedades en condiciones basales, observando que en condiciones espontáneas la tasa de disparo era muy baja (< 2 Hz) o en algunas ocasiones silente.

Todas las neuronas estudiadas incrementaron su frecuencia de disparo durante la estimulación sensorial. En un primer análisis,

se representó la distribución de intervalos interespiga cuyos parámetros nos permitieron extraer medidas de las características de disparo de las neuronas. Así, las distribuciones monomodales eran representativas de la presencia de espigas individuales con mayor o menor grado de ritmicidad. El ajuste de este tipo de distribución a una curva correspondiente a la inversa de una gaussiana nos proporcionó la frecuencia de disparo de las neuronas. La presencia de bimodalidad en la distribución hubiese sido indicativa de espigas agrupadas en ráfagas, con intervalos inter e intraráfagas. La posibilidad de distribuciones bimodales se verificó mediante el índice de Hartigans. En nuestro caso, no se encontró actividad en ráfagas durante ninguno de los periodos experimentales (índice de Hartigans > 0.5). De forma global, la respuesta de las neuronas consistió en un patrón de descarga fásico seguido por un patrón estacionario de mayor frecuencia.

Con el fin de conseguir un agrupamiento de las neuronas que atendiera a sus parámetros de disparo en las condiciones experimentales, se optó por realizar un análisis de *clusters* basado en la extracción de componentes principales derivado de las variables de tasa de disparo, coeficiente de variación (CV) e índice de ritmicidad (RI). Para ello, se calcularon los parámetros de disparo en diferentes tramos de actividad que incluyesen periodos basales y de estimulación, en ventanas no solapadas de 500 ms. El cálculo de los componentes principales determinó que el primer componente PC1 era capaz de explicar un 80 % de la variabilidad entre patrones de disparo, mientras que el PC2 representó el 10 % de variabilidad. El cálculo de componentes principales adicionales no supuso un incremento significativo en la precisión del cálculo. No obstante, cuando el PCA se realizó únicamente en los periodos de estimulación, el PC1 justificó el 90 % de la variabilidad entre datos. De esta forma, se pudo determinar que el PC1 se relacionó con la frecuencia de disparo evocada durante la estimulación, mientras que el PC2 explicaba la variabilidad de disparo en el periodo basal. Finalmente, el análisis PCA evidenció tres grupos neuronales según el algoritmo *k-means*. Los grupos derivados del agrupamiento mostraron diferencias significativas en su tasa de disparo, coeficiente de variación (CV) e índice de ritmicidad (RI).

Se observó que dos de los grupos obtenidos presentaban propiedades similares a los encontrados en trabajos anteriores. No obstante, estas tipologías neuronales presentaron diferencias sustanciales respecto a lo anteriormente descrito. Mientras que la tasa de disparo de todas las neuronas incrementó con la estimulación, ciertos grupos se volvieron más regulares llegando, incluso, a presentar disparos rítmicos. Notablemente, un tercer grupo de neuronas presentó actividad unitaria en rango theta durante la

Tabla 4: Patrón de disparo de los distintos tipos neuronales de NI

Tipo	n(%)	Basal		Espontáneo	
		Frecuencia	CV	Frecuencia	CV
I	28 (33)	4.85 ± 0.70	0.86 ± 0.12	$13.80 \pm 0.68^{**}$	$0.58 \pm 0.13^{**}$
II	8 (10)	15.64 ± 2.90	0.51 ± 0.09	18.97 ± 2.62	0.51 ± 0.08
III	48 (57)	1.96 ± 0.23	0.88 ± 0.04	$5.05 \pm 0.95^{**}$	$0.63 \pm 0.23^{**}$

Tipo	n(%)	RPO		Tail pinch	
		Frecuencia	CV	Frecuencia	CV
I	28 (33)	$10.70 \pm 0.59^{**}$	$0.60 \pm 0.08^{**}$	$14.10 \pm 0.56^{**}$	$0.56 \pm 0.05^{**}$
II	8 (10)	17.87 ± 0.85	0.49 ± 0.07	$20.48 \pm 1.10^{*}$	0.55 ± 0.08
III	48 (57)	$4.98 \pm 0.26^{**}$	$0.62 \pm 0.11^{**}$	$5.36 \pm 0.33^{**}$	$0.70 \pm 0.04^{**}$

(*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$

estimulación. Un resumen de la estadística de cada grupo puede observarse en la figura 23 y 24. A continuación se exponen las características electrofisiológicas de los distintos tipos neuronales del NI. Sus propiedades de disparo en condiciones basales, así como ante diferentes estados de activación theta, se encuentran resumidas en la tabla 4.

Resulta conveniente aclarar que, en este estudio, la mayor parte de las neuronas registradas fueron las pertenecientes al tipo III, ya que son la mayor contribución al trabajo presentado, si bien es verdad que los resultados incluyen a los tres tipos neuronales. Por ello, cabe recalcar que la proporción de neuronas de NI presentes en este trabajo no es representativa de la densidad poblacional de las mismas. La mayor parte de las neuronas estudiadas (57 %) pertenecieron al tipo III, mientras que un 33 % al tipo I y solo un 10 % al tipo II.

4.2.3 Las neuronas tipo I del núcleo incertus presentan actividad no rítmica en presencia de actividad theta hipocámpica

La estimulación eléctrica de larga duración en RPO permitió observar un incremento de la tasa de disparo de las neuronas tipo I del NI. Estas neuronas incrementaron significativamente su tasa de disparo tras la activación eléctrica de la formación reticular, pasando de 4.85 ± 0.70 hasta 10.70 ± 0.59 espigas/s ($Z = -4.562$; $p < 0.01$) con una regularización del intervalo

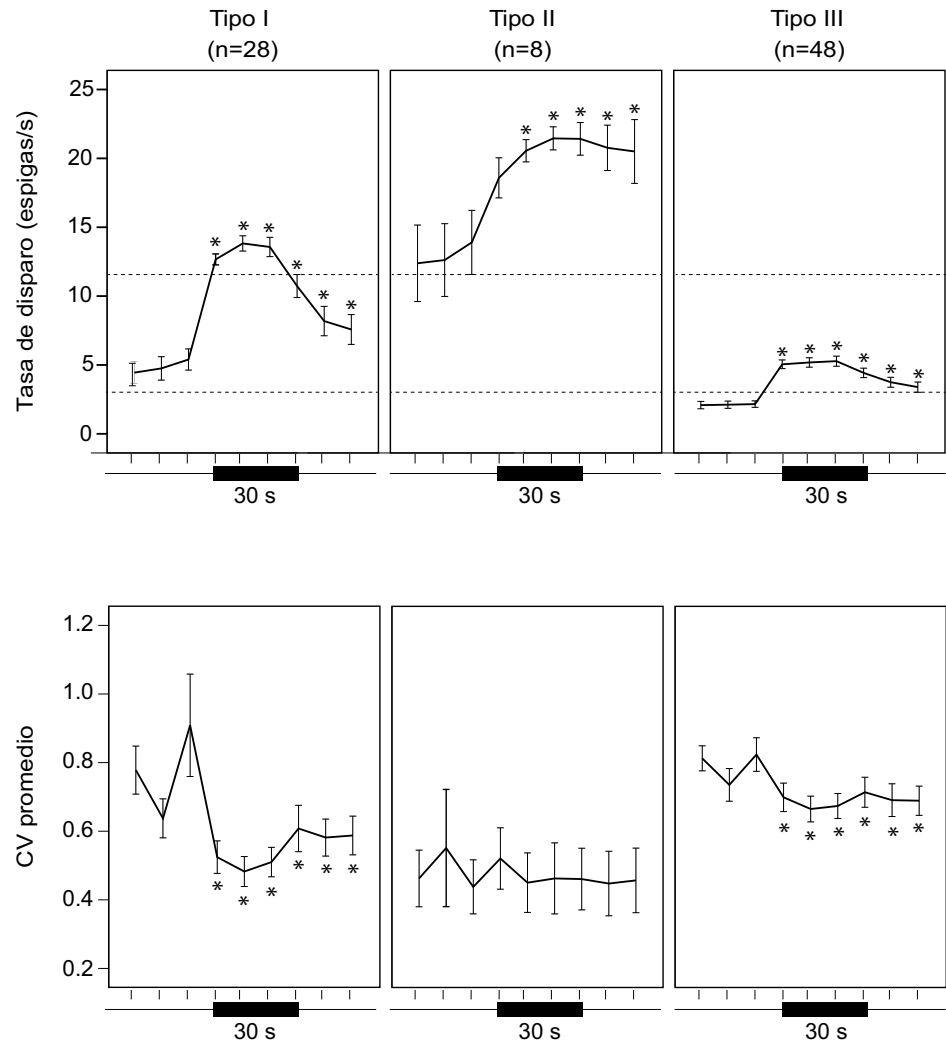


Figura 23: Evolución temporal de la tasa de disparo y CV de los distintos tipos neuronales. **Arriba.** Evolución de la tasa de disparo, en ventanas de 10 s, de los distintos tipos neuronales. Se puede observar el periodo basal, la estimulación sensorial (*tail pinch*, señalado como una franja negra) y el tramo post-estimulación. Con la misma estructura, en los paneles de **abajo** se puede observar la evolución del coeficiente de variación. Los valores representados son la media \pm SEM.

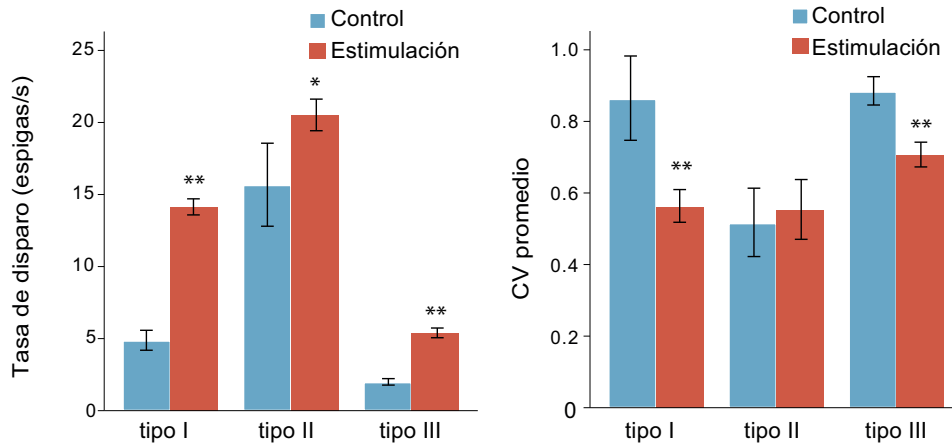


Figura 24: Tasa de disparo y CV de los distintos tipos neuronales. Media \pm SEM de la tasa de disparo (**izquierda**) y el coeficiente de variación (**derecha**) para los distintos tipos neuronales, comparando las condiciones basales frente a la estimulación sensorial.

interespiga, pero sin alcanzar un CV menor a 0.5, necesario para poder considerarlas rítmicas ($CV = 0.60 \pm 0.08$; $Z = -4.005$; $p < 0.01$), como puede observarse en su perfil de ISIH (figura 28A).

A fin de estudiar detenidamente la relación de estas neuronas con la actividad theta hipocámpica, se llevaron a cabo estudios de actividad bajo estimulación sensorial de larga duración. El grupo de neuronas tipo I estudiadas en estas condiciones ($n = 28$, 33 %) consistió en neuronas de disparo no rítmico a frecuencia theta en condiciones de baja potencia theta hipocámpica (tasa de disparo, 4.85 ± 0.70 espigas/s; $CV = 0.86 \pm 0.12$). Estas neuronas se correspondían con las descritas previamente como neuronas tipo I. Con la estimulación sensorial, estas neuronas incrementaron rápidamente su tasa de disparo mas allá del rango theta (14.10 ± 0.56 espigas/s, $Z = -4.62$, $p < 0.01$), presentando un patrón de actividad mas regular ($CV = 0.56 \pm 0.05$, $Z = -2.82$, $p < 0.01$; figura 25A, figura 23 panel izquierdo y figura 24). En esta situación, 15/28 neuronas presentaron un $CV < 0.5$, con índice de ritmicidad entre 0.87 y 4.23.

Finalmente, el estudio se completó mediante la detección de tramos de actividad theta espontánea en el hipocampo que nos permitieran determinar las propiedades de disparo de las neuronas en condiciones espontáneas ajenas a la manipulación. Del grupo de neuronas tipo I se encontraron 12, de entre las 28 descritas que, bajo condiciones de theta espontáneo, incrementaron significativamente su tasa de disparo respecto de su actividad basal, alcanzando valores de 13.80 ± 0.68 espigas/s y un CV de 0.58 ± 0.13 ($Z = -3.95$, $p < 0.01$; tabla 4).

4.2.4 *Las neuronas tipo II del núcleo incertus muestran una actividad a alta frecuencia durante los periodos theta*

Con la estimulación eléctrica en RPO se pudo observar un ligero aumento de la tasa de disparo de las neuronas tipo II, pasando de 15.64 ± 2.90 a 17.87 ± 0.85 espigas/s, si bien este cambio en sus dinámicas de actividad no fue significativo ($Z = -1.367$, $p = 0.17$; $CV = 0.49 \pm 0.07$, $Z = -0.708$, $p = 0.48$, figura 28B).

Con el *tail pinch* se pudieron describir ocho neuronas tipo II ($n = 8$, 10 %), lo que hizo que existiera una gran variabilidad en los datos. Como se había descrito previamente (Núñez et al., 2006), durante el periodo basal, estas neuronas presentaban una elevada tasa de disparo, con un patrón muy regular (15.64 ± 2.88 espigas/s; $CV = 0.51 \pm 0.09$). Con la estimulación sensorial, la actividad de este grupo neuronal incrementó significativamente (20.58 ± 1.10 espigas/s, $Z = -0.98$, $p < 0.05$), pero su patrón de ritmicidad no se vio alterado ($CV = 0.55 \pm 0.08$, $Z = -0.98$, $p > 0.05$; figura 25B), manteniendo valores de RI entre 1.16 y 2.60 (figura 23 panel central y 24).

De entre las 8 neuronas tipo II encontradas, únicamente se pudieron encontrar 3 de ellas que satisfacían las condiciones de admisibilidad para el estudio de la actividad durante tramos de theta espontáneo (tramos de más de 5 s con un mínimo del 50 % de actividad theta hipocámpica). El bajo número de datos no permitió encontrar diferencias significativas con sus propiedades de disparo durante las condiciones basales (tasa de disparo: 18.97 ± 2.62 , $Z = -0.88$, $p = 0.37$; $CV = 0.51 \pm 0.08$, $Z = -0.68$, $p = 0.49$; tabla 4).

4.2.5 *Las neuronas tipo III del núcleo incertus disparan regularmente a frecuencia theta durante la activación hipocámpica*

Los resultados anteriores ratifican las primeras caracterizaciones descritas en resultados previos concernientes a la caracterización electrofisiológica de las neuronas del NI. Sin embargo, cuando los estímulos eléctricos en RPO fueron superiores a 5 s, se pudo identificar un patrón de disparo neuronal dentro del rango theta (figura 22A). Este resultado supuso el reconocimiento de un tercer grupo neuronal (tipo III) que respondía a situaciones de activación mantenida. Estas neuronas se mostraban silentes, o con una baja tasa de disparo, en condiciones basales (1.96 ± 0.23 espigas/s), presentando además una dinámica de disparo irregular en sus intervalos interespiga ($CV = 0.88 \pm 0.04$). Tras la estimulación eléctrica pontina de larga duración, las neuronas incrementaron significativamente su tasa de disparo hasta alcanzar el

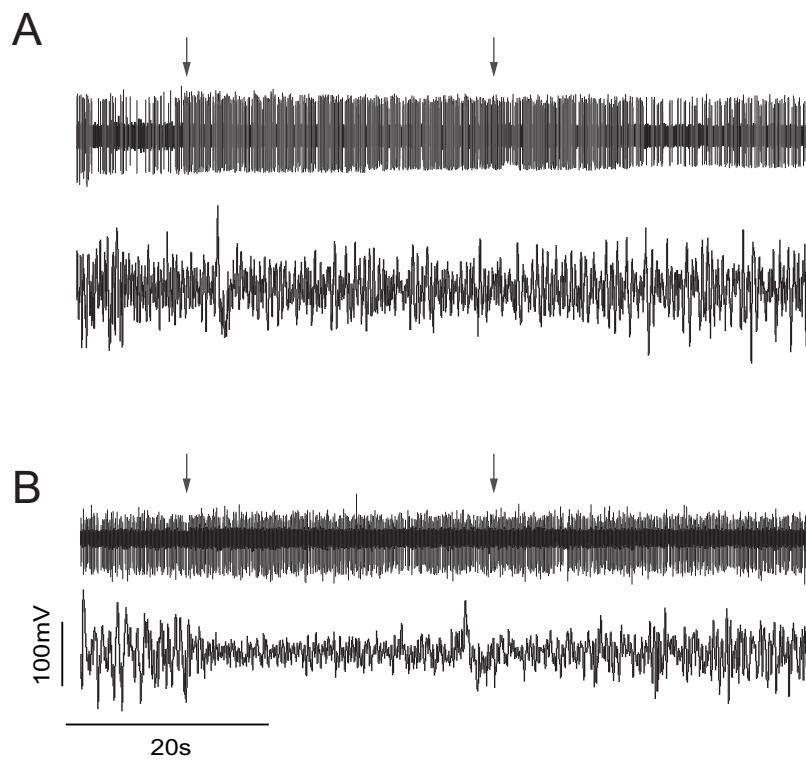


Figura 25: Registros de neuronas tipo I y II. **A.** Registro modelo de una neurona tipo I junto con el correspondiente LFP hipocámpico. **B.** Registro modelo de una neurona tipo II junto con el correspondiente LFP hipocámpico. En ambos casos, se observa una estimulación sensorial (*tail pinch*, delimitado por flechas).

rango theta (4.98 ± 0.26 espigas/s; $Z = -3.906$; $p < 0.01$), regularizando su patrón de actividad ($CV = 0.62 \pm 0.11$; $Z = -3.593$; $p < 0.01$, figura 28C).

La estimulación sensorial de larga duración nos permitió registrar neuronas que, en condiciones basales, presentaron un patrón de disparo muy lento o irregular, mostrando en algunos casos frecuencias inferiores a 0.1 Hz; estas neuronas fueron clasificadas como neurona tipo III ($n = 48$, 57%; figura 22C). El *tail pinch* incrementó significativamente la tasa de disparo de estas neuronas hasta alcanzar valores dentro del rango theta (5.36 ± 0.34 espigas/s, $Z = -5.84$, $p < 0.01$), mostrando una actividad con mayor regularidad ($CV = 0.70 \pm 0.04$, $Z = -4.23$, $p < 0.01$). Ambos cambios presentaron significación estadística (figura 24). Algunas de las neuronas tipo III no solo incrementaron su regularidad con la estimulación, si no que se volvieron rítmicas (11 de 48) con valores de CV inferiores a 0.5 y de RI entre 0.97 y 3.09. Estas neuronas dispararon a una tasa de 7.44 ± 0.64 espigas/s. La evolución temporal de la tasa de disparo de estas neuronas tipo III (figura 23, panel derecho), mostró que su actividad descendió gradualmente tras el cese de la estimulación, permaneciendo, no obstante, dentro del rango theta durante el periodo post-estimulación. Durante este tramo, la actividad unitaria mostró mayor regularidad que durante el tramo basal, evidenciándose por valores inferiores del CV.

Para completar el análisis de la actividad de las neuronas tipo III, se amplió el estudio a periodos de theta hipocámpico espontáneo (figura 22B). De las 48 neuronas tipo III, se analizaron un total de 28 en estas condiciones, presentando un incremento en la tasa de disparo, hasta alcanzar el rango theta (5.04 ± 0.95 espigas/s, $Z = -4.53$, $p < 0.01$) y una actividad con mayor regularidad que durante el periodo basal ($CV = 0.62 \pm 0.24$, $Z = -4.53$, $p < 0.01$; tabla 4).

En resumen, el análisis mostrado nos permitió extender la clasificación funcional previa, establecida para las neuronas del NI. De esta forma, se describieron tres grupos neuronales en el NI, atendiendo a su patrón de disparo y a su regularidad. Las neuronas tipo I dispararon de forma no rítmica dentro del rango theta durante el periodo basal, adquiriendo actividad rápida y regular con la estimulación. Las neuronas tipo II mostraron un patrón de disparo rápido y regular durante el tramo basal, incrementando su frecuencia con la estimulación y permaneciendo regulares en su disparo. Las neuronas tipo III fueron casi silentes durante el periodo control, con una actividad muy irregular, con mayores valores de ritmicidad dentro del rango theta durante la estimulación. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la presencia de una actividad theta endógena en el NI, asociada

a la aparición de ritmo theta en el hipocampo, generada por la tasa de disparo rítmica de las neuronas tipo III.

4.2.6 *Las neuronas tipo III del núcleo incertus se acoplan a la oscilación theta hipocámpica*

En nuestro estudio, todas las neuronas de NI presentaron tasas de disparo cambiantes con la aparición de actividad theta en el hipocampo, pudiendo ser catalogadas en conjunto como neuronas *theta-on*. En este apartado se comparó la actividad poblacional del hipocampo extraída de registros LFP, con la actividad unitaria transformada a partir de la función de densidad de espigas (SDF). De esta manera, tal y como se describió en la metodología, ambas señales pueden ser utilizadas como series temporales con los mismos valores de muestreo y, por tanto, hacer uso de los métodos analíticos de sincronización de señales.

En primer lugar, los datos apuntan a que diferentes poblaciones neuronales de NI mantienen distinta correlación con la actividad del hipocampo. La actividad correlacionada entre ambas estructuras puede dar pistas del papel que las neuronas de NI juegan en la actividad de hipocampo. Para comprender la posible relación entre las neuronas del NI y la actividad oscilatoria de hipocampo, se analizaron primero cuatro parámetros en relación al theta evocado bajo condiciones de estimulación sensorial. Por un lado, se analizó el espectrograma cruzado *wavelet* entre el LFP de hipocampo y la SDF de las neuronas de NI (figuras 29,30,31 y 32). Por otro, se calcularon los valores de propensión theta (TPI), el tiempo compartido en banda theta (STT) y, finalmente, los valores de acoplamiento de fase (PLV), todos ellos representados en las figuras 33 y 34.

Previo al análisis exhaustivo, a fin de asegurarnos de que la información obtenida con la SDF se encuentra relacionada con las propiedades de disparo obtenidas con anterioridad (figura 26), se estimó la SDF promedio para todas las neuronas de los distintos grupos, en la situación de estimulación sensorial (figura 27). Durante el *tail pinch*, el espectrograma promedio, realizado a partir de la SDF, mostró un rango de frecuencias dentro de las bandas establecidas con los cálculos previos a partir de la secuencia de espigas: neuronas tipo I, 16.19 ± 0.50 espigas/s; neuronas tipo II, 20.91 ± 0.34 espigas/s; neuronas tipo III, 3.46 ± 0.21 espigas/s. El test de Kruskal-Wallis, seguido por una prueba *post hoc* de Mann-Whitney para datos no paramétricos, indicó que los tres grupos presentaron distribuciones significativamente distintas ($p < 0.05$).

Las SDF de las neuronas se compararon con la actividad obtenida del LFP de hipocampo, mediante el análisis *wavelet* (figura

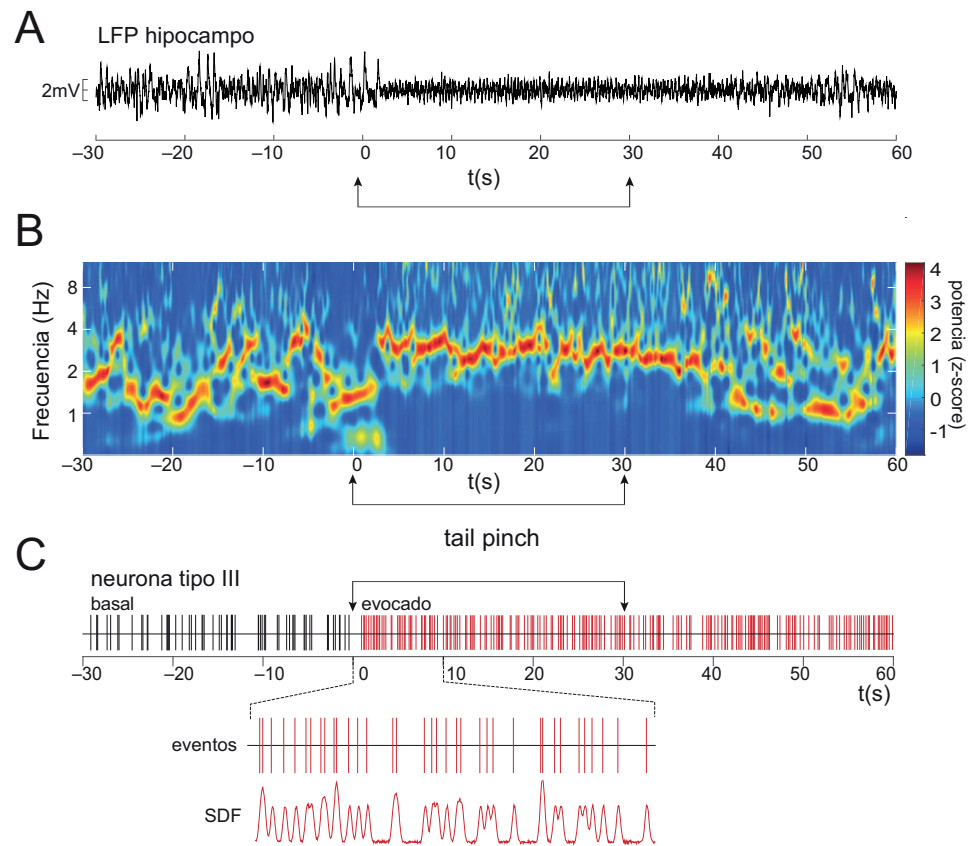


Figura 26: Efecto del *tail pinch* en la actividad LFP de hipocampo y en las neuronas de NI; caso representativo. **A.** Señal cruda del LFP hipocámpico y su **(B)** correspondiente espectrograma wavelet. **C.** Actividad de una neurona tipo III de NI, simultánea al registro LFP, con su transformada SDF.

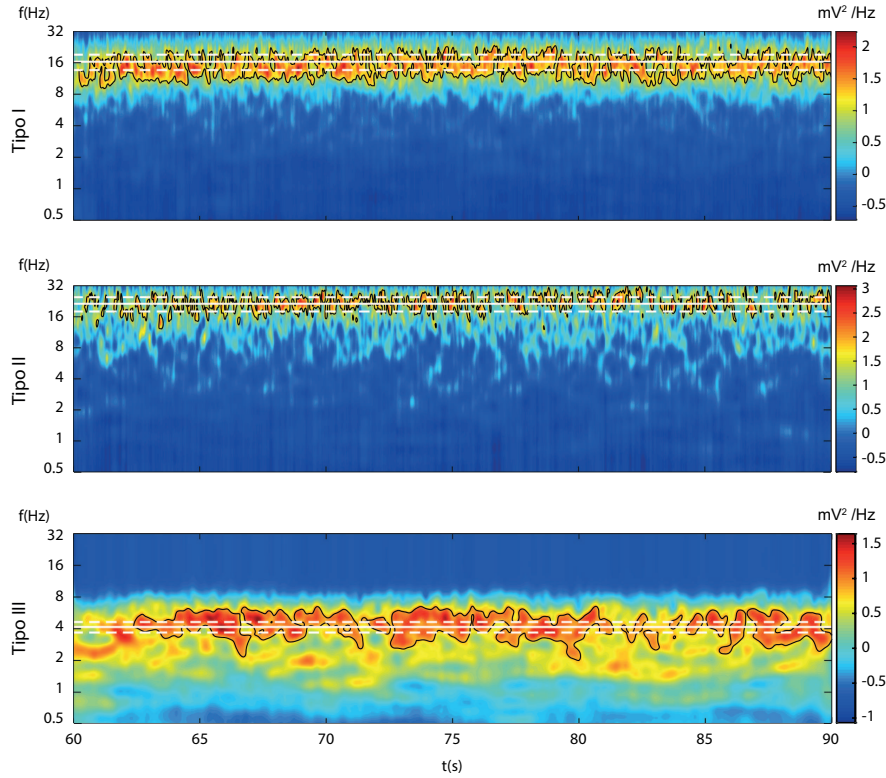


Figura 27: Espectrograma wavelet promedio, de los distintos grupos neuronales, calculado a partir de la SDF. Los espectrogramas representan los periodos de estimulación sensorial (*tail pinch*). La descomposición tiempo-frecuencia se representa con una escala colorimétrica representando la potencia de los coeficientes wavelet normalizados. Las líneas blancas continuas y las discontinuas representan la media \pm SEM, respectivamente. Las neuronas tipo I mostraron una actividad predominante entre los 12 a 15 Hz; las neuronas tipo II se caracterizaron por una actividad de mayor frecuencia, de entre 18 a 20 Hz; finalmente, las neuronas tipo III mostraron una concentración de potencia espectral dentro de los límites de la banda theta.

26A y B). Como puede observarse en las figuras 29, 30 y 31 (casos representativos) la actividad de cada grupo de neuronas reflejó una distinta correlación con la actividad hipocámpica, la cual es dependiente de la presencia o ausencia del estímulo aplicado. El espectrograma cruzado de la actividad de las neuronas tipo I, junto con el hipocampo, mostró un incremento de actividad conjunta en frecuencias superiores a la banda theta durante la estimulación sensorial (figura 29). Por su parte, las neuronas tipo II, con tasas de disparo rápido, presentó el menor grado de correlación con la oscilación theta hipocámpica (figura 30). Las neuronas tipo III por su parte empezaron a disparar en respuesta al inicio de la estimulación, exhibiendo la mayor tendencia a disparar a frecuencia theta y mostrando la mayor correlación con la actividad theta hipocámpica (figura 31 y 32). Adicionalmente, la figura 28 muestra los histogramas interespiga de neuronas pertenecientes a los diferentes grupos, tanto en condiciones basales como bajo estimulación sensorial. Se puede observar el cambio de la tasa de disparo en las distribuciones de los ISIH.

Nuestros resultados mostraron que todas las neuronas del NI presentaron variaciones en su patrón de disparo en situaciones de activación theta hipocámpica, lo que las catalogaría como neuronas *theta-on*, si bien la forma de relacionarse con la actividad hipocámpica fue diferente para cada subgrupo (figura 33). Con el propósito de acotar esta relación, se determinó la coincidencia temporal en banda theta de la actividad unitaria del NI junto con la actividad oscilatoria del hipocampo.

En condiciones basales, las neuronas tipo I y el hipocampo tenían una presencia equiparable de ritmicidad theta (TPI, 1.17 ± 0.13) aun siendo la actividad de las neuronas independiente del theta hipocámpico (STT, 0.08 ± 0.01). No obstante, la activación del hipocampo llevó a dichas neuronas a perder su tendencia a disparar en frecuencias theta, separándose así de la actividad hipocámpica (STT, 0.07 ± 0.01 , $t = 1.13$, $p > 0.05$; TPI, 0.60 ± 0.07 , $t = 3.81$, $p < 0.01$). Estos valores ponen de manifiesto la posible independencia entre hipocampo y las neuronas tipo I de NI en el rango de las frecuencias theta, aún siendo neuronas cuya actividad cambia al activarse el hipocampo.

Por su parte, las neuronas tipo II, con tasas de disparo medias altas en los periodos de dominancia theta en hipocampo, no parecen mostrar episodios de actividad en las frecuencias theta, ya que dieron valores bajos de STT sin cambios significativos entre los periodos control y los de estimulación. En condiciones basales, la ratio STT fue de 0.06 ± 0.02 , con valores de TPI de 0.63 ± 0.24 . No se encontraron diferencias significativas durante el periodo de estimulación, con una STT de 0.06 ± 0.02 ($t = 0.02$, $p > 0.05$) y un TPI de 0.62 ± 0.21 ($t = 0.03$, $p > 0.05$). Consi-

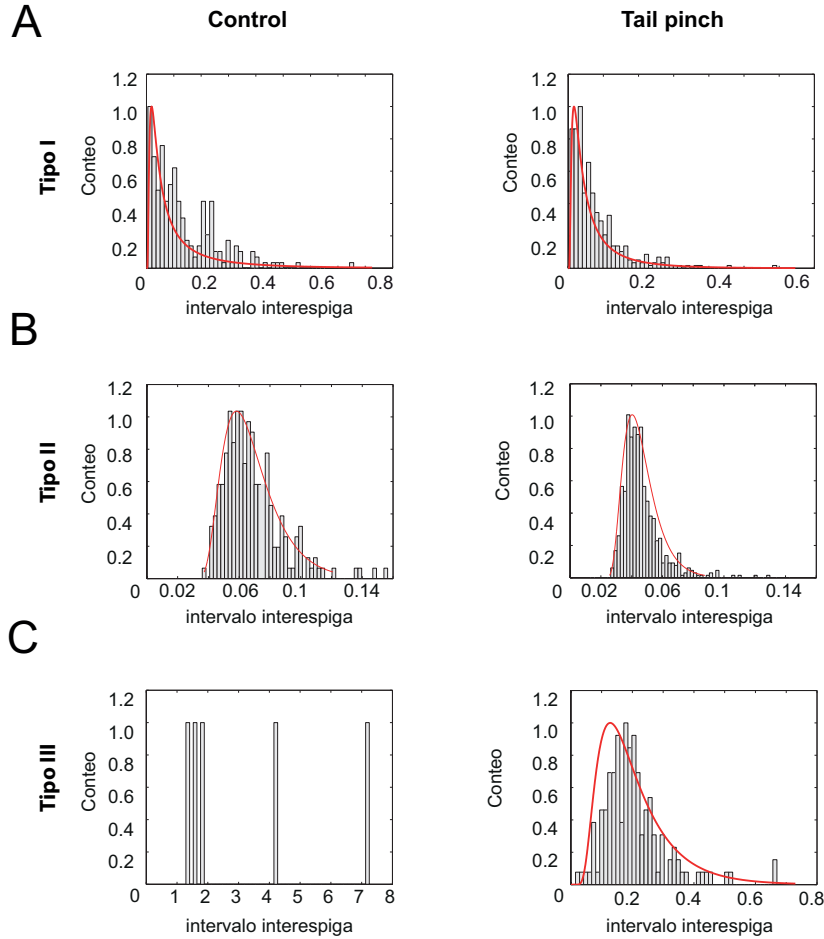


Figura 28: Intervalos interespiga representativos para los distintos grupos neuronales. **A.** Las neuronas tipo I mostraron distribuciones irregulares durante los momentos basales, adquiriendo un patrón de disparo mas regular a frecuencias superiores a theta, con la estimulación sensorial. **B.** El ISIH de las neuronas tipo II mostró una actividad rápida en condiciones basales, incrementando su tasa de disparo durante el *tail pinch*. **C.** Las neuronas tipo III mostraron ISIHs muy irregulares durante el periodo control, mostrando regularidad de disparo a frecuencia theta durante la estimulación sensorial. Todos los gráficos se han ajustado a una distribución doble gaussiana.

Neuronas tipo I del NI

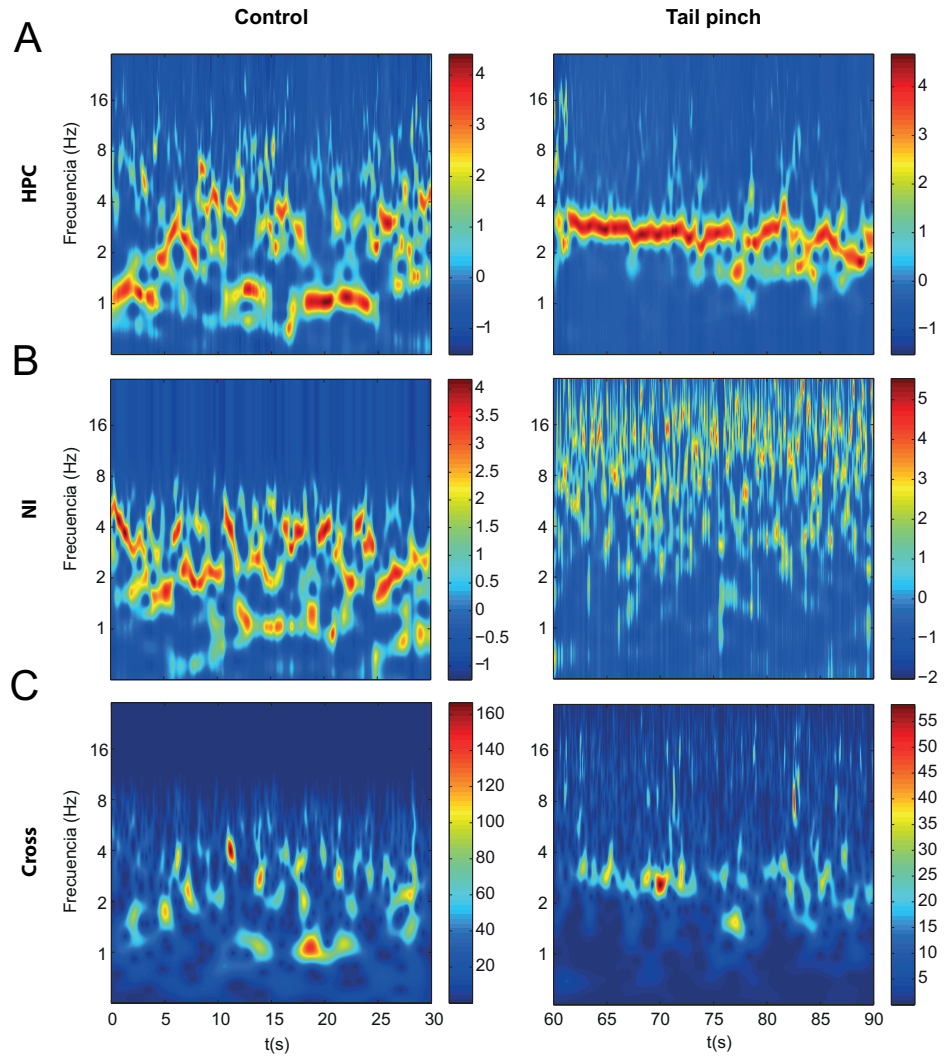


Figura 29: Relación entre la actividad de hipocampo y la de una neurona tipo I de NI. **A** y **B**. Espectrograma wavelet de la actividad LFP de hipocampo y de la convolución de las neuronas tipo I, respectivamente, en condiciones basales y bajo estimulación sensorial. **C**. El *tail pinch* indujo un ligero acoplamiento a frecuencia theta entre ambas señales.

Neuronas tipo II del NI

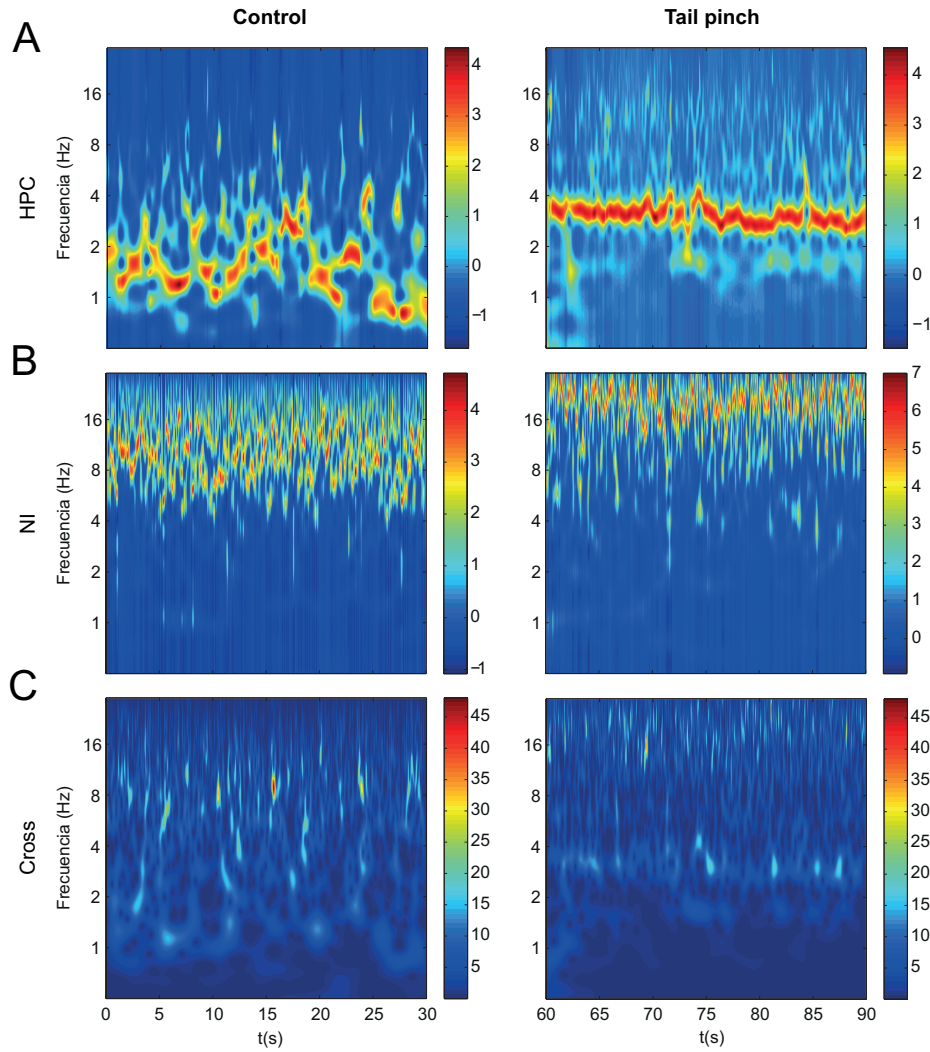


Figura 30: Relación entre la actividad de hipocampo y la de una neurona tipo II de NI. **A** y **B**. Espectrograma wavelet de la actividad LFP de hipocampo y de la convolución de las neuronas tipo II, respectivamente, en condiciones basales y bajo estimulación sensorial. **C**. La activación sensorial mostró una falta de sincronización entre el hipocampo y las neuronas tipo II durante los periodos de actividad theta hipocámpica.

Neuronas tipo III del NI

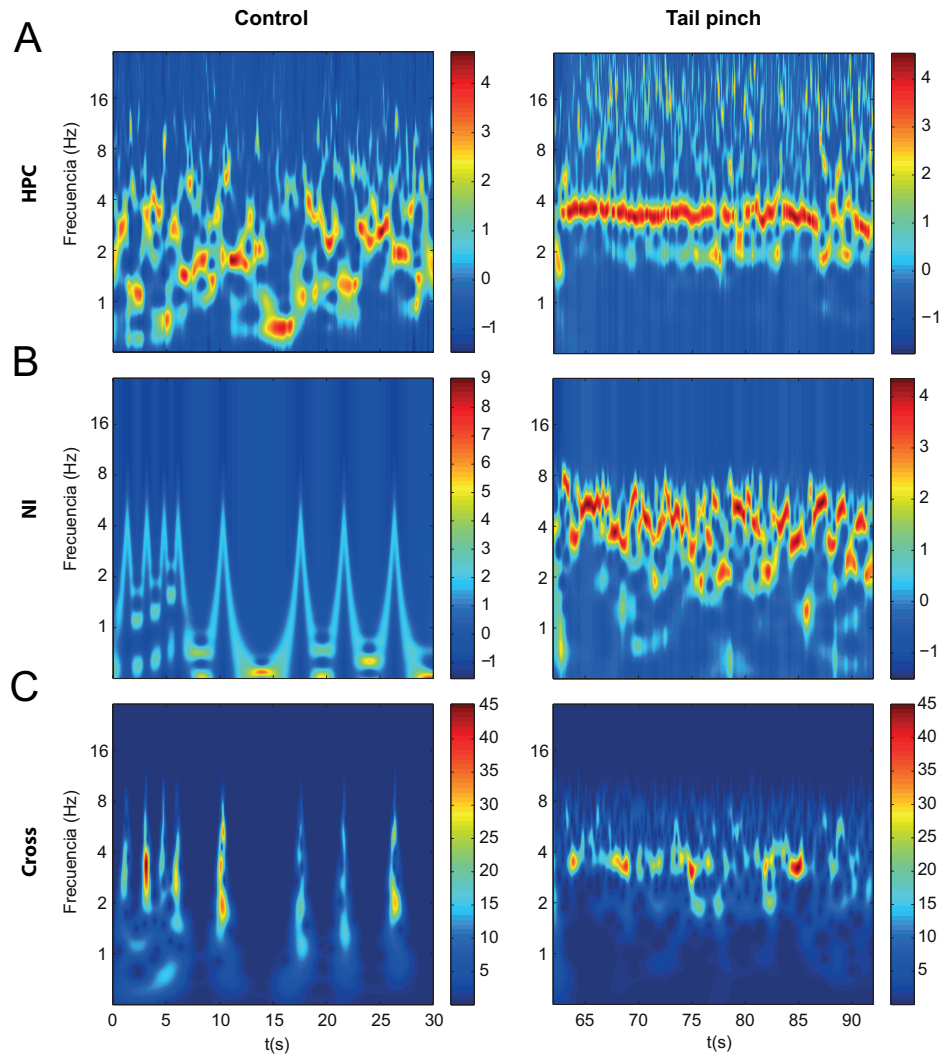


Figura 31: Relación entre la actividad de hipocampo y la de una neurona tipo III de NI. **A** y **B**. Espectrograma wavelet de la actividad LFP de hipocampo y de la convolución de las neuronas tipo III, respectivamente, en condiciones basales y bajo estimulación sensorial. **C**. El *tail pinch* mostró un aumento del acoplamiento a frecuencia theta entre la señal de hipocampo y la tasa de disparo de las neuronas tipo III.

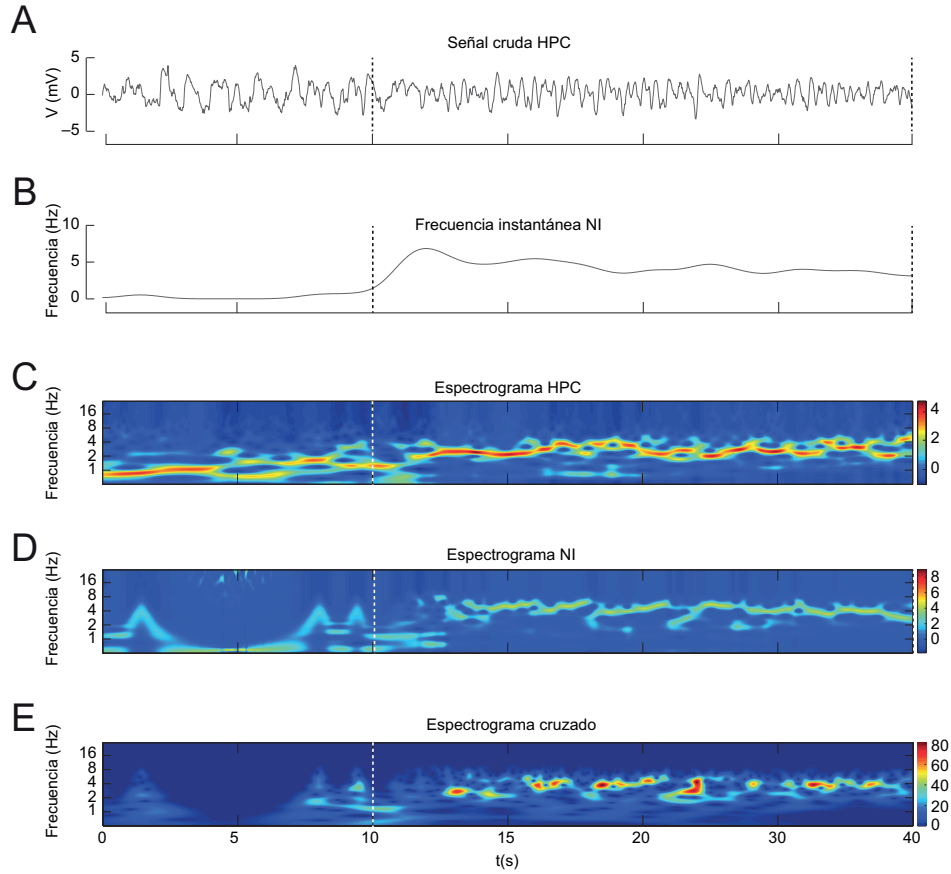


Figura 32: Detalle de la actividad del LFP de hipocampo y de una neurona tipo III de NI, durante 40s. La línea blanca punteada representa el inicio del *tail pinch*. **A.** Señal cruda del LFP de hipocampo donde se observa la ritmicidad theta generada por la activación sensorial. **B.** Frecuencia instantánea (espigas/s) de una neurona tipo III; estas neuronas mostraron actividad theta solo tras el inicio de la estimulación. **C y D.** Espectrogramas wavelet del LFP de hipocampo y de la convolución de la neurona tipo III. **E.** El espectrograma cruzado muestra sincronización en rango theta, entre ambas señales, con la activación sensorial del animal. Las barras de color representan la normalización *z-score* de la energía espectral (C y D) y unidades arbitrarias (E).

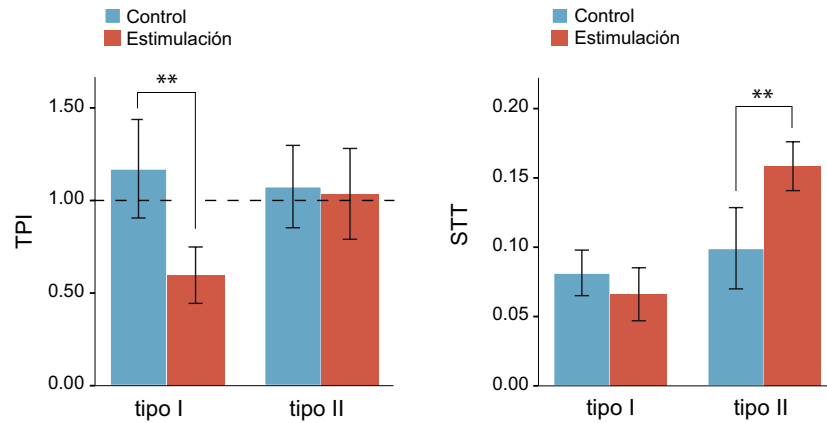


Figura 33: Índice de propensión al theta (TPI, **izquierda**) y Tiempo compartido en theta (STT, **derecha**) de las neuronas tipo I y III. Los valores representan la media \pm SEM. Valores de TPI >1 indican una mayor propensión a disparar en rango theta, en comparativa con el hipocampo. Las neuronas tipo I obtuvieron valores de TPI mas elevados durante condiciones basales, perdiéndolos con la estimulación sensorial. No se observaron cambios significativos en su STT. Las neuronas tipo III mostraron TPI cercanos a 1 y su STT incrementó en respuesta al *tail pinch*.

derando la tasa de disparo de las neuronas tipo II, con valores medios por encima de los 15 Hz tanto en los estados basales como activos, estos resultados indican que estas neuronas actúan de manera independiente a la activación hipocámpica. Sin embargo, las activaciones sostenidas de hipocampo mediante *tail-pinch*, demuestran que también las neuronas tipo II pueden ser consideradas neuronas *theta-on*, al incrementar su tasa de disparo entre los estados basal y activo (ver tabla 4 y figura 23).

En contraposición, las neuronas tipo III mostraron valores de TPI cercanos a 1 durante ambos periodos, basal y estimulación, indicativo de una alta preferencia a trabajar en frecuencias theta junto al hipocampo. Su STT incrementó durante la estimulación sensorial (basal, 0.09 ± 0.01 ; estimulación, 0.16 ± 0.01 ; $t = -4.35$, $p < 0.01$), mientras que el TPI se mantuvo a niveles similares (basal, 1.10 ± 0.10 ; estimulación, 1.04 ± 0.12 , $t = 0.21$, $p > 0.05$). Estos resultados sugieren que las neuronas tipo III exhiben actividad rítmica a frecuencia theta acompañando a la actividad espontánea o evocada en hipocampo. Los resultados de TPI y STT para los grupos neuronales con actividad theta (neuronas tipo I y III) pueden observarse en la figura 33.

Con estos resultados podemos resaltar la presencia en NI de dos grupos de tipologías neuronales, atendiendo a su relación con la ritmicidad theta del hipocampo. El primer grupo, con las neuronas tipo I y II, correlacionan con la activación hipocámpica

Tabla 5: Evolución de los valores de acoplamiento de fase de las neuronas tipo III del NI, en periodos de 10 s, durante la estimulación sensorial (estim) y el periodo post-estimulación (post).

	Periodo	PLV promedio	PLV > 0.5	PLV > 0.9
estim	1	0.68 ± 0.04	72.9 %	31.2 %
	2	0.65 ± 0.04	75.0 %	25.0 %
	3	0.61 ± 0.04	66.6 %	20.8 %
post	1	0.71 ± 0.04	72.9 %	39.6 %
	2	0.64 ± 0.04	68.7 %	29.2 %

fuera del rango de frecuencias theta; el segundo grupo, con las neuronas tipo III, comparte actividad dentro de las frecuencias theta, siendo así la población de neuronas más correlacionada con las ondas theta del hipocampo.

Estos datos nos llevan a detallar el grado de acoplamiento entre las neuronas tipo III y la oscilación theta del hipocampo. La prueba que mejor evidencia la sincronización entre dos señales se obtiene del cálculo del acoplamiento de sus fases (Lachaux et al., 1999). Si las neuronas de NI disparan en el mismo rango de fases de la oscilación hipocámpica significará que existe un acoplamiento de sus actividades. Una representación del acoplamiento de fases de un caso representativo, así como de los datos grupales, puede observarse en la figura 34A y B respectivamente. Se encontró un incremento en el acoplamiento de fases, al comienzo de la estimulación, entre el LFP de hipocampo y las neuronas tipo III de NI. Este acoplamiento fue decayendo progresivamente durante el *tail pinch* pero mostró un ligero incremento durante los primeros diez segundos del periodo post-estimulación. La gran mayoría de las neuronas tipo III exhibieron valores de PLV superiores al 0.5, con valores superiores al 0.9 en alguna de ellas. Un resumen de los datos puede observarse en la tabla 5. No obstante, la evolución de los PLV promedio no mostró significación estadística (Test de Friedman, $\chi^2 = 5.58$, $p = 0.23$). Aun así, se contabilizó un mayor número de neuronas con mayores valores de PLV al principio y al final de la estimulación (figura 34B). Cabe destacar que la mayoría de neuronas tipo III llegaron a una preferencia de fase durante el periodo de estimulación, atendiendo al test de uniformidad de Rayleigh.

Estos resultados proporcionan valores que sugieren el acoplamiento de las neuronas tipo III y las oscilaciones theta del hipocampo. Sin embargo, aún no siendo despreciables y observando ligeros aumentos de las medidas de PLV, no es concluyente la

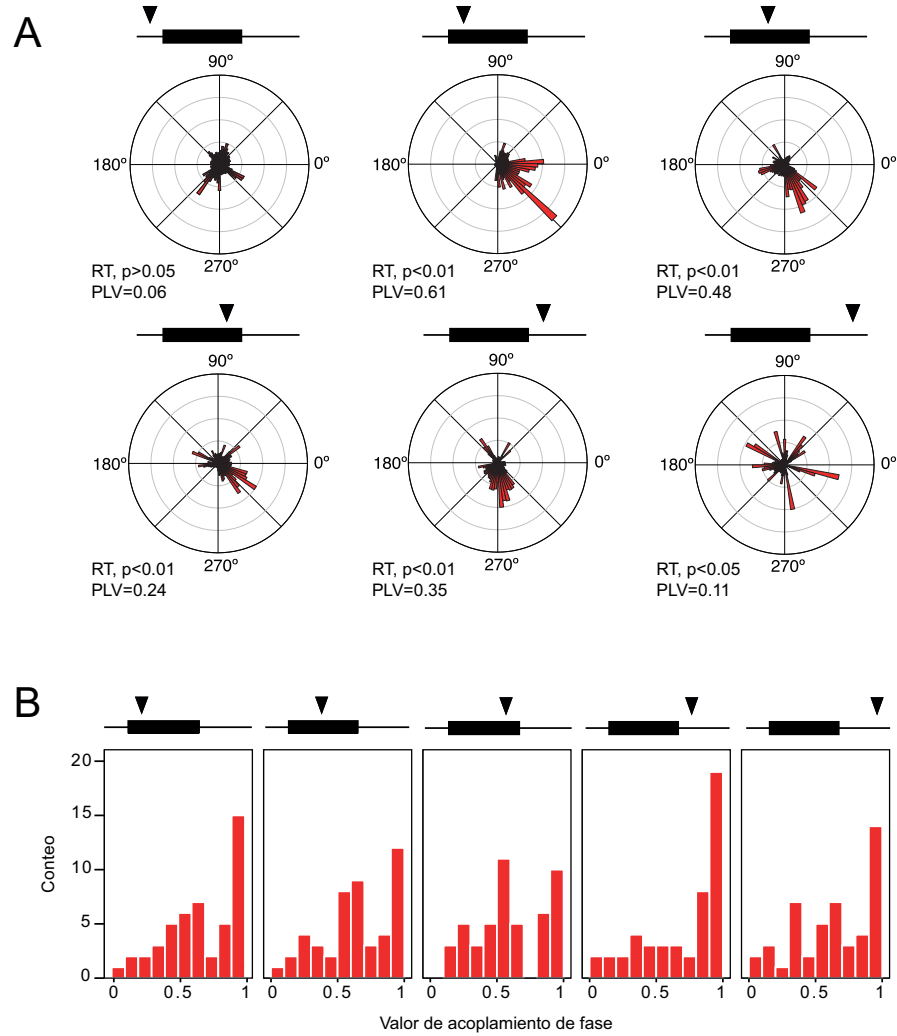


Figura 34: Acoplamiento de fase de las neuronas tipo III de NI con el LFP de hipocampo. **A.** Diagramas de rosa mostrando los ángulos preferentes de acoplamiento de fase en ventanas de 10 s, mostrando periodos pre-estimulación, *tail pinch* y post-estimulación. Un fuerte aumento del valor de preferencia de fase puede observarse al principio de la ventana de estimulación. **B.** Conteo de todas las neuronas tipo III en función de sus valores de PLV segmentados en ventanas de 10 s. La gran mayoría de neuronas que consiguieron valores de $PLV \geq 0.8$ se registraron al principio y al final del periodo de estimulación.

verificación de la hipótesis que describiría la actividad de las neuronas de NI moduladas por las ondas theta hipocámpicas. Hay dos razones que podrían explicar estos datos. El primer argumento que se plantea es que la ritmicidad de las neuronas tipo III no es marcada, lo que dificulta que sus espigas se mantengan en un rango de fases de las ondas theta suficientemente limitado como para mostrar signos de acoplamiento. El segundo de los argumentos proviene de la metodología en el cálculo del PLV. El filtrado de las señales LFP crudas de hipocampo en frecuencias theta, con el propósito de detectar las fases para esa banda, puede no ajustarse en el tiempo ante los cambios temporales de la frecuencia dominante. Con este inconveniente, la proporción de acoplamiento puede ser baja.

Por ello, quisimos dar otro tipo de medidas de sincronización que verificara un papel activo de las neuronas tipo III en la relación del NI con el hipocampo. Las medidas aportadas hasta el momento representan únicamente las relaciones lineales entre las distintas variables observadas. No obstante, en el estudio de las dinámicas neuronales se hace necesario un método que permita determinar tanto las relaciones lineales como no lineales establecidas entre dos variables. En este sentido, la información mutua (MI) cuantifica la información compartida por dos variables aleatorias dentro de un marco probabilístico. La MI, dentro del marco de la Teoría de la Información, tiene como objetivo describir la dinámica espacio-temporal del intercambio de información detectando relaciones no lineales presentes en los sistemas biológicos.

Por una parte, se calculó la MI de las distribuciones de potencia de los espectrogramas wavelet de las señales de neuronas tipo III de NI e hipocampo en cuatro ventanas de 10 s (una periodo de pre-estimulación y tres ventanas consecutivas de estimulación sensorial). Con el *tail pinch*, los valores de MI incrementaron significativamente (Test de Friedman, $\chi^2 = 23.30$; $p < 0.01$; figura 35), recobrando valores basales progresivamente. Durante el tramo pre-estimulación, se obtuvieron valores de MI de 0.11 ± 0.007 bits, incrementando significativamente durante el primer (0.17 ± 0.010 bits; Test de Dunn, $p < 0.001$) y el segundo intervalo de estimulación (0.15 ± 0.0120 bits; Test de Dunn, $p < 0.01$). Durante el último periodo de estimulación, la información mutua volvió a adquirir valores similares al basal (0.13 ± 0.009 bits; Test de Dunn, $p > 0.9$). Esta aproximación confiere consistencia a la existencia de una interrelación entre ambas poblaciones neuronales.

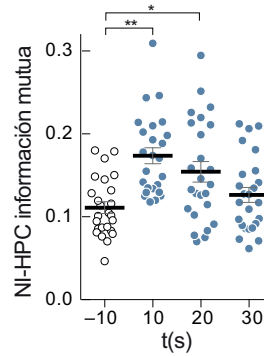


Figura 35: Información mutua entre hipocampo y NI. Representación de la información mutua entre las neuronas tipo III del NI e hipocampo durante condiciones basales (-10 s, puntos blancos) y durante theta evocado (10 , 20 y 30 s, puntos azules).

4.3 EXPERIMENTO 3: ESTUDIO DE LA CAUSALIDAD ENTRE LAS NEURONAS DEL NÚCLEO INCERTUS Y LA ACTIVIDAD OSCILATORIA DE HIPOCAMPO

El experimento 1 mostró trazas de causalidad en ambas direcciones entre NI e hipocampo, con predominio del flujo NI \rightarrow HPC. El hecho de haber encontrado actividad unitaria a frecuencias theta en un grupo particular de neuronas de NI, y que las frecuencias de disparo de las tres poblaciones descritas sea diferente, nos llevó a estudiar las relaciones causales de los tres tipos neuronales con el hipocampo en los estados theta. En esta ocasión, partimos de las SDF de las neuronas de NI extraídas en el apartado anterior y de los registros LFP de hipocampo tras activación sensorial de larga duración (*tail pinch*, 30 s). En estas condiciones, antes que fijarnos en si hay o no causalidad entre ambas series temporales, el planteamiento debe ser el calcular los valores de causalidad en el dominio de las frecuencias para averiguar si las actividades de las neuronas ante el theta hipocampo tiene flujos netos en alguna de las dos direcciones.

4.3.1 *La actividad theta hipocámpica evocada por tail pinch es dependiente del núcleo incertus*

El primer paso para demostrar la dependencia del theta hipocámpico de la activación de NI fue plantear si la inactivación de NI era capaz de eliminar el theta sensorial en hipocampo. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inactivación del NI mediada por la infusión de muscimol en el propio núcleo en un total de 8 animales, siendo 5 de ellos válidos tras la verificación histológica (figura 41 arriba).

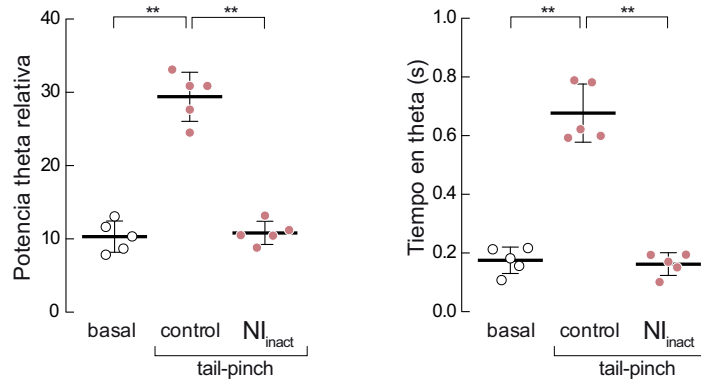


Figura 36: A la **izquierda**, efecto de la potencia relativa del theta hipocámpico durante condiciones basales y bajo condiciones de estimulación sensorial tanto en situación control como con inactivación de NI. A la **derecha**, tiempo relativo en que hipocampo permanece en theta durante los periodos basal y evocados (relativo a 30 s).

Nuestros resultados indicaron que el theta evocado por *tail pinch* depende de la actividad de NI, ya que la inhibición neuroquímica de este núcleo, evitó el incremento de potencia en el registro de la actividad theta de hipocampo (Test de Friedman, $\chi^2 = 7.6$; $p < 0.05$; figura 36 izquierda). Las comparaciones múltiples (Corrección de Dunn) entre las tres condiciones mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la potencia del estado basal y del theta espontáneo ($0.10 \pm 0.01 \mu V^2 \text{ Hz}^{-1}$) y del evocado por estimulación sensorial ($0.30 \pm 0.02 \mu V^2 \text{ Hz}^{-1}$). Tras la inactivación de NI, la potencia del theta hipocámpico fue similar a la registrada en condiciones basales ($0.11 \pm 0.01 \mu V^2 \text{ Hz}^{-1}$). La propensión a permanecer en ritmicidad theta, definido como el tiempo a frecuencia theta normalizado para la ventana completa de medida con potencia theta relativa por encima del tercer cuartil, mostró una reacción similar (Test de Friedman, $\chi^2 = 7.6$; $p < 0.05$; corrección de Dunn para comparaciones múltiples; figura 36 derecha). La propensión al theta de hipocampo durante el periodo basal (0.17 ± 0.02) fue claramente inferior que tras la estimulación sensorial (0.68 ± 0.04 ; $p < 0.05$). El *tail pinch* durante la inactivación de NI llevó a unos valores similares a los encontrados en condiciones de ausencia de theta hipocámpico (0.16 ± 0.02 ; $p > 0.05$).

4.3.2 Las neuronas del núcleo incertus presentan relaciones causales significativas con la actividad del hipocampo

Se cuantificó la causalidad de Granger entre la actividad de los disparos neuronales del NI y la señal de hipocampo, en el dominio de las frecuencias, mediante la *función de transferencia*

dirigida (DTF). Cuando se dan relaciones causales, la DTF muestra picos de direccionalidad en un sentido, mientras que en el sentido opuesto se observa una depleción de causalidad; este efecto pone de manifiesto un flujo de información neto entre ambos nodos.

Estas medidas se llevaron a cabo con las series temporales correspondientes al LFP hipocámpico y la SDF obtenida a partir de las neuronas de NI. Las series temporales mostraron características propias de señales no estacionarias, por lo que se dividieron en segmentos solapantes (50 %) de 5 s. El tamaño de estos segmentos fue escogido para conseguir un balance entre la estacionariedad y el ajuste del modelo. Mientras que los segmentos temporales de menor tamaño proporcionan una mayor estacionariedad, los segmentos más largos generan mejores estimaciones del modelo autoregresivo utilizado en el análisis causal.

Se detectaron interacciones causales significativas entre la actividad unitaria de NI y la señal LFP de hipocampo (figura 37). De manera global, los tres tipos neuronales presentaron relaciones asimétricas con las oscilaciones de hipocampo, es decir, las medidas obtenidas para ambas direcciones de flujo eran significativamente diferentes con predominio de una de las direcciones. Como ejemplo (figura 37A), las neuronas tipo III, con un patrón de disparo asociado al theta, revelaron fuertes interacciones causales en la dirección NI→HPC en la banda theta. La mayoría de los periodos basales, con ausencia de theta, no mostraron un flujo neto entre las señales, con valores de DTF por debajo del umbral (test de permutación, $p < 0.01$) en ambos sentidos (figura 37A, primera imagen). Se detectaron segmentos de actividad theta tanto en periodos espontáneos (figura 37, segunda imagen), como durante *tail pinch* (figura 37A, tercera imagen). En ambos casos, los valores de DTF mostraron picos por encima del umbral (test de permutación, $p < 0.01$) dentro de la banda theta; el sentido NI→HPC mostró valores más elevados ($\text{DTF} \geq 0.8$; $p < 0.01$) que el sentido contrario HPC→NI ($\text{DTF} < 0.2$; $p > 0.05$). En los periodos de actividad evocada, se registraron picos beta causales en el sentido HPC→NI en los mismos periodos en los que los valores DTF en frecuencias theta muestra picos en sentido NI→HPC (figura 37A, cuarta imagen).

Este perfil de causalidad se evidencia en los datos promedio para cada grupo neuronal, con picos significativos en la DTF para alguna de las dos direcciones de forma significativa (figura 37B). Los datos globales para las neuronas tipo III revelaron que las relaciones causales significativas en el sentido NI→HPC se dan en el rango theta (3.74 ± 0.25 Hz; figura 37A), mientras que en la dirección HPC→NI la causalidad se observa en un rango de frecuencias diferente (11.56 ± 4.32 Hz). Este dato hace pensar

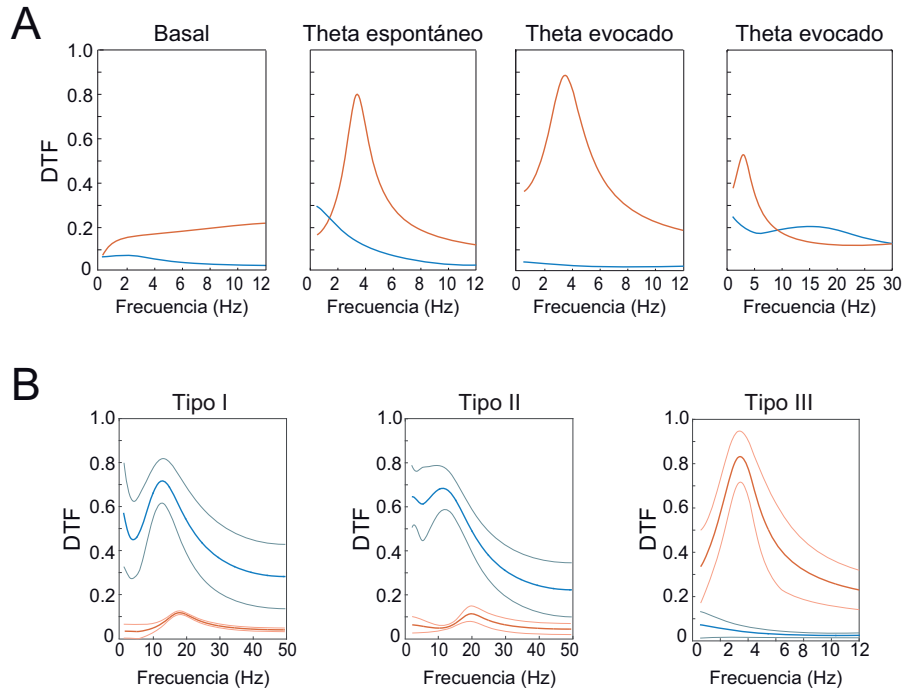


Figura 37: Análisis de causalidad de Granger en un marco bivalente para el LFP de hipocampo y la SDF de las neuronas de NI. **A.** Distribución espectral de la función de transferencia directa (DTF) para ambos sentidos (azul para HPC→NI; naranja para NI→HPC) en una neurona tipo III. Nótese los picos causales a frecuencia theta durante los periodos de activación hipocámpica. **B.** Distribución de la DTF promedio para los tres tipos neuronales. Las líneas gruesas representan los valores promedio (con el mismo código de colores para los diferentes sentidos), mientras que las líneas finas indican la desviación estándar.

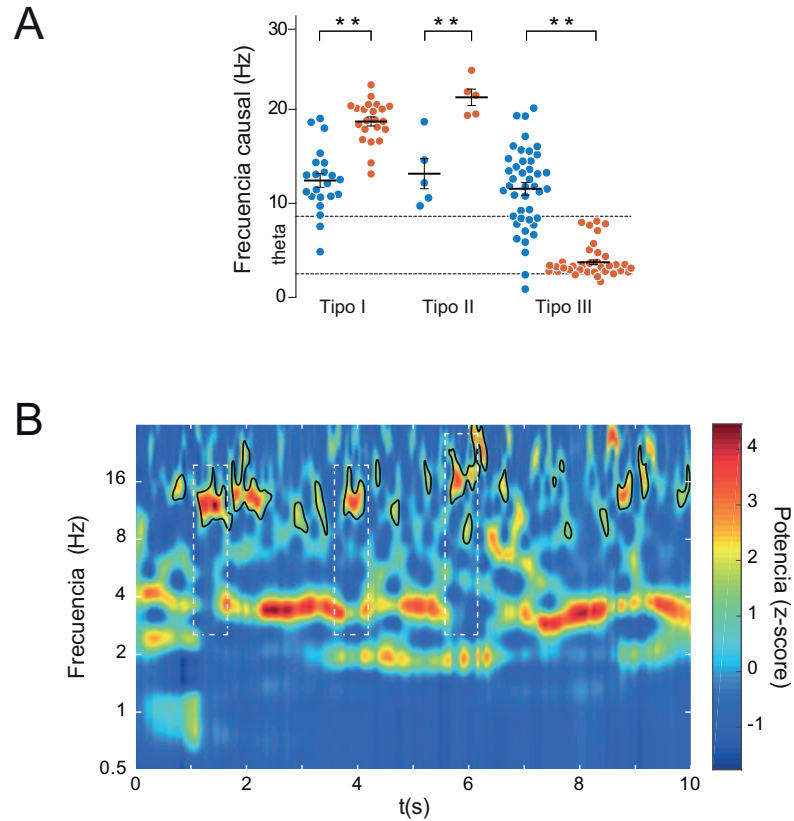


Figura 38: Causalidad entre hipocampo y NI. **A.** Distribución de frecuencias causales, calculadas como picos en el espectrograma DTF. Para cada tipo neuronal se representa el valor promedio y el error estándar de la media (azul para HPC→NI; naranja para NI→HPC). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. **B.** Espectrograma wavelet del LFP de hipocampo para un caso representativo. Nótese la presencia de actividad beta de acuerdo con los picos theta detectados en el espectrograma DTF para las neuronas tipo I. Las líneas blancas punteadas remarcan los periodos beta en los tramos en ausencia de theta.

en la existencia de un flujo de información bidireccional entre ambas estructuras a diferentes frecuencias.

Por otro lado, las neuronas tipo I y tipo II (figura 37B y figura 38A) mostraron picos DTF en el sentido HPC→NI, en la banda de 10 a 20 Hz. De forma más específica, ambos tipos neuronales presentaron picos significativos de causalidad, HPC→NI, en los 12.43 ± 0.72 Hz (tipo I) y 13.16 ± 1.61 Hz (tipo II). El sentido inverso, NI→HPC, mostró picos significativos en distintos rangos de frecuencias: 18.72 ± 0.48 Hz para las neuronas tipo I ($t = 4.42$, $p < 0.01$) y 21.29 ± 0.88 Hz para las tipo II ($t = 7.47$, $p < 0.001$). No obstante, no se encontraron picos dentro del rango theta en el sentido neurona a LFP en ninguno de estos tipos neuronales.

Por tanto, el estudio permitió demostrar que existe una direccionalidad diferencial que gobierna el flujo de información entre

hipocampo y NI, durante la presencia de actividad theta hipocámpica. De manera global, la interacción causal $HPC \rightarrow NI$ se da en la banda 10 a 20 Hz para los tres tipos neuronales (Kruskal-Wallis, $H = 0.42$, $p = 0.81$), mientras que el flujo $NI \rightarrow HPC$ se encuentra presente en todos los casos, pero la banda varía en función de la tipología neuronal estudiada (Kruskal-Wallis, $H = 49.70$, $p < 0.001$). Las oscilaciones de hipocampo en banda beta parecen las responsables de inducir en los tres grupos neuronales de NI una relación causal. De igual modo, las neuronas tipo I y II causan en el hipocampo actividad beta, mientras que las neuronas tipo III parecen las responsables de influir en el hipocampo en la banda de frecuencias theta. Estos resultados pueden ser apreciados al observar tramos de los registros LFP de hipocampo (figura 38B), en los que sus espectrogramas wavelet muestran predominantemente regiones con alta potencia theta entre las que se incrustan cortos periodos con dominio de ondas beta.

Esta primera descripción se complementó estudiando el patrón de causalidad en el dominio tiempo-frecuencia. La figura 39A ilustra el flujo causal para un caso representativo de una neurona tipo III. En este mapa colorimétrico se puede observar la presencia de zonas cálidas, indicadoras de causalidad $NI \rightarrow HPC$, que incrementan significativamente con la activación sensorial. Aún con baja presencia, el flujo causal $HPC \rightarrow NI$, de colores fríos, se visualizó en una banda de frecuencias superior a las theta (10 a 20 Hz) y, principalmente, durante la pre-estimulación.

En términos estadísticos, los tres grupos neuronales mostraron diferente propensión para ambos sentidos causales (figura 39B). La detección temporal de tramos de causalidad significativa, permitió estudiar la evolución del flujo de información entre ambas estructuras. Las neuronas tipo I y tipo II presentaron, principalmente, un flujo dominante desde hipocampo. Las neuronas tipo I mostraron elevados valores de causalidad en el sentido $HPC \rightarrow NI$ en ambas condiciones experimentales (basal: Wilcoxon, $W = -120$, $p < 0.001$; evocado: Wilcoxon, $W = -217$, $p < 0.001$), con una mayor ratio temporal en la misma dirección durante el theta evocado (Wilcoxon, $W = 260$, $p < 0.001$). Por el contrario, el sentido $NI \rightarrow HPC$ presentó valores inferiores durante ambas condiciones experimentales sin diferencias entre ellos (Wilcoxon, $W = 35$, $p = 0.09$). Las neuronas tipo II mostraron un comportamiento similar, si bien es verdad que el bajo número de ejemplares hizo que los análisis no fueran significativos, pero si mostraron una tendencia con una mayor ratio temporal en el sentido $HPC \rightarrow NI$ (basal: Wilcoxon, $W = -10$, $p = 0.12$; evocado: Wilcoxon, $W = -15$, $p = 0.06$). De la misma manera, se observó una tendencia de cambio entre el periodo basal

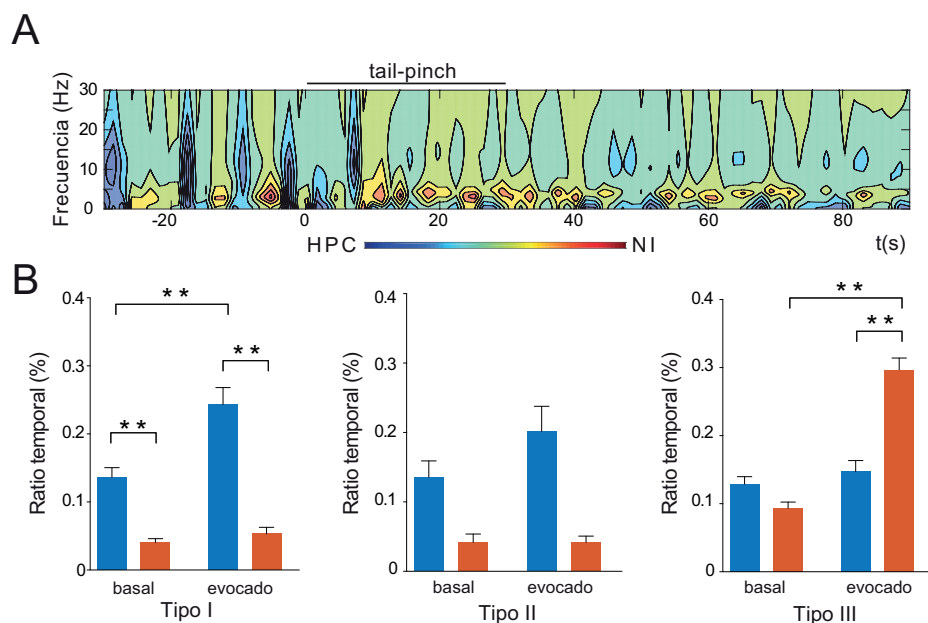


Figura 39: Relaciones causales entre el LFP hipocámpico y la actividad neuronal de NI. **A.** Representación tiempo-frecuencia de la relación causal entre el hipocampo y una neurona tipo III de NI; caso representativo. **B.** Estadística de la proporción temporal con causalidad significativa para cada tipo neuronal, para ambos sentidos (azul para HPC→NI; naranja para NI→HPC). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

y de theta evocado en el sentido opuesto (Wilcoxon, $W = 10$, $p = 0.06$).

Por su parte, las neuronas tipo III presentaron una propensión diferencial en sentido NI→HPC dependiente del estado de hipocampo. Mientras que en los periodos basales la ratio temporal para ambos sentidos mostró valores similares (Wilcoxon, $W = -215$, $p = 0.09$), durante el periodo theta evocado, el tiempo en sentido NI→HPC vio incrementado su ratio (Wilcoxon, $W = 654$, $p < 0.001$). No se encontraron diferencias en la ratio HPC→NI entre el periodo basal y el de theta evocado (Wilcoxon, $W = 214$, $p = 0.08$).

En resumen, ambos sentidos causales pueden darse como forma de interrelación entre el hipocampo y NI. No obstante, la relación es diferente según el tipo neuronal estudiado. Las neuronas tipo I y II de NI son más propensas a recibir información por parte de hipocampo; por su parte, las neuronas tipo III mostraron un flujo preferente de información hacia hipocampo, lo que podría indicar un efecto activo sobre la génesis de la ritmicidad theta hipocámpica.

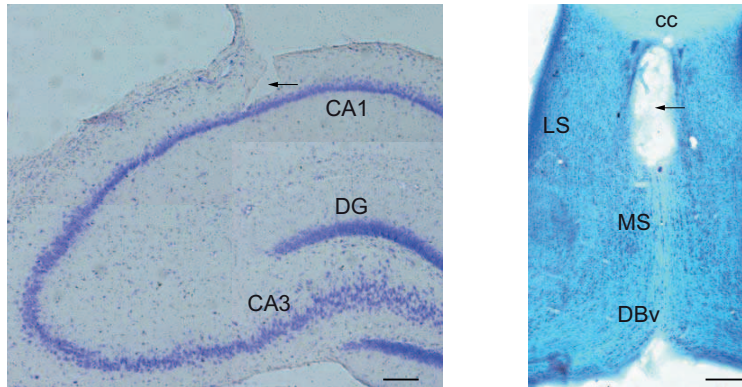


Figura 40: Verificación histológica de la lesión producida por el electrodo LFP en la CA1 de hipocampo (**izquierda**) y del lugar de inyección de MS/DB (**derecha**). Imágenes compuestas.

4.4 EXPERIMENTO 4: ESTUDIO DEL REINICIO DE LA FASE DE LA OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA TRAS LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO INCERTUS

Viendo que el NI participa activamente en la generación del theta hipocámpico, y que su actividad presenta un alto grado de acoplamiento con la de hipocampo, se planteó cuál sería la manera en la que las neuronas de NI inciden en la actividad hipocámpica.

Se emplearon un total de 16 animales de los cuales 11 presentaron un correcto emplazamiento del electrodo de estimulación dentro de los límites del NI (figura 41, abajo). Los 5 animales restantes (figura 41, medio) se emplearon como controles de estimulación eléctrica fuera del NI. En 5 de los 11 animales con electrodo en NI, se llevó a cabo la inactivación de septum medial por infusión local de un anestésico (figura 40, derecha). En todos los casos se comprobó histológicamente el emplazamiento del electrodo de la CA1 de hipocampo (figura 40, izquierda).

4.4.1 *La estimulación eléctrica del núcleo incertus produce un reajuste de la oscilación theta de hipocampo*

En este trabajo se pretendió clarificar los mecanismos por los que el NI es capaz de influenciar en la ritmicidad theta del hipocampo. Los resultados de causalidad nos llevaron a observar un grupo de neuronas que, trabajando a frecuencia theta, eran capaces de anticipar la oscilación hipocámpica en dicha frecuencia. Así, las neuronas de NI podrían desempeñar un papel crucial en la generación de la oscilación theta hipocámpica. Nuestra hipótesis de partida fue que el NI era capaz de producir un reinicio

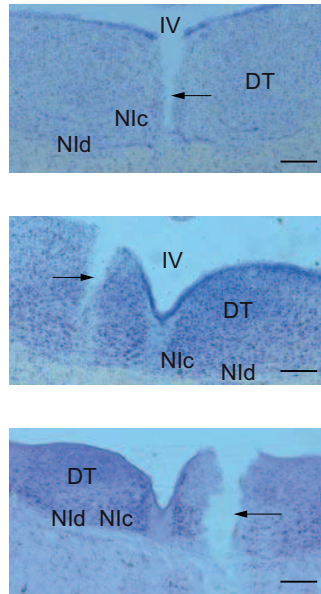


Figura 41: Verificación histológica de la inyección de muscimol en NI (**arriba**), el emplazamiento del electrodo de estimulación eléctrica fuera de los límites del NI (**medio**) y del electrodo de estimulación dentro de los límites del NI (**abajo**).

en la fase de la oscilación theta de hipocampo que permitiera obtener un control sobre la modulación de la misma.

Los resultados demostraron que la suministración de un único pulso eléctrico en NI es condición suficiente para evocar actividad theta en hipocampo, si bien la duración de esta actividad no supera mas que unos 2 – 3 ciclos oscilatorios en CA1. En la figura 42A se puede observar como la señal de hipocampo, filtrada en theta, mostró un incremento en su amplitud tras el pulso. Este fenómeno se observa de forma mas clara en el espectrograma wavelet, donde se aprecia un incremento local en la potencia theta tras la aplicación del pulso eléctrico en NI. Esta tendencia se mantuvo en el promedio de todos los pulsos dentro de los experimentos (figura 42B). En general, la respuesta hipocámpica evocada por el pulso eléctrico en NI provocó un incremento significativo del theta registrado en el LFP de CA1 ($Z = 2.93; p < 0.01$), la cual duró unos 2.54 ± 0.16 ciclos theta y presentó un valor de potencia máximo a los 285.45 ± 34.55 ms. La presencia de ciclos aumentados y de un pico de potencia theta significativa en el espectro de potencias sugirieron un posible efecto de reinicio de la fase de la actividad theta hipocámpica ante un input del NI. Si no existiera este reinicio, la oscilación promedio post-pulso aparecería como una línea plana de menor potencia.

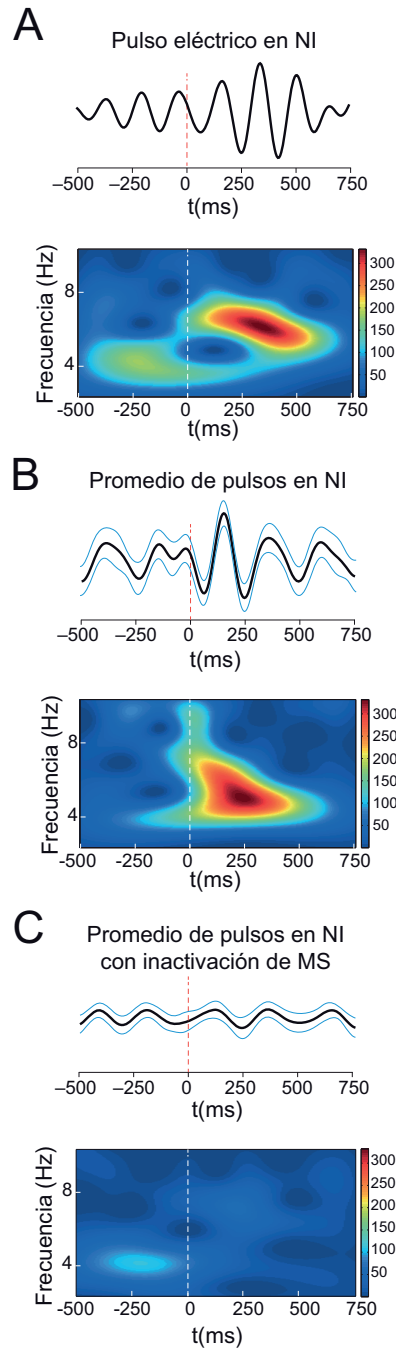


Figura 42: Efecto del pulso eléctrico en NI sobre el LFP de hipocampo. **A.** Señal de hipocampo filtrada en theta y su correspondiente espectrograma wavelet de un único pulso eléctrico en NI. Se puede observar un incremento de potencia theta tras el pulso. **B.** Señal de hipocampo promedio filtrada en theta y su correspondiente espectrograma wavelet para todos los pulsos eléctricos en NI de un mismo experimento. Al igual que en el caso de un único pulso, se observa un incremento de potencia theta tras la estimulación de NI. **C** Señal de hipocampo promedio filtrada en theta y su correspondiente espectrograma wavelet para todos los pulsos eléctricos en NI de un mismo experimento de inhibición de MS/DB. Las líneas punteadas verticales representan el pulso eléctrico; las líneas finas en los registros filtrados representan el SEM.

Una mayor evidencia del reinicio la proporcionó el estudio de la distribución de fases para todos los pulsos de los experimentos. Se estudió la preferencia de fase (test de Rayleigh) para todas las señales LFP filtradas en theta y alineadas al pulso eléctrico. Se observó un claro reajuste de la fase tras el pulso eléctrico en NI (figura 43A, arriba), evidenciado por un mayor grado de acoplamiento de las fases de las ondas theta (test de Rayleigh, $p < 0.05$). Este resultado sugiere la existencia de un reinicio de la fase theta hipocámpica acoplado temporalmente al estímulo en NI. La representación temporal de los p -valores del test de Rayleigh (figura 43A, abajo) indicó que las fases theta se acoplaron a los 107.89 ± 33.57 ms tras la aplicación del pulso en NI, permaneciendo fijadas durante 406.55 ± 43.19 ms. El reinicio se registró a una frecuencia promedio de 5.59 ± 0.54 Hz y con una duración de 2.18 ± 0.23 ciclos.

El emplazamiento erróneo del electrodo de estimulación en el NI ($n = 5$) nos permitió llevar a cabo un control de la especificidad del efecto de reinicio mediado por el NI. No se observó incremento de la potencia theta tras la estimulación en los ejemplares en los que el electrodo de estimulación se encontraba en áreas vecinas a NI ($Z = 0.54$; $p > 0.05$). Adicionalmente, la distribución de fases no mostró ningún efecto, observándose una distribución de fases uniforme en el tiempo en todos los casos (test de Rayleigh, $p > 0.05$; figura 43B).

4.4.2 *La inactivación del septum medial evita el reinicio de la actividad theta de hipocampo mediado por el núcleo incertus*

Los experimentos anteriores permitieron demostrar que el NI participa activamente de la oscilación theta hipocámpica, ya que su activación es capaz de reiniciar la oscilación hipocámpica. Debido a que una de las principales eferencias de NI es el complejo SM/BD (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008), se consideró estudiar si dicho reinicio se producía a través de la vía septal hacia hipocampo. Para ello, se inhibió el MS/DB con una inyección de procaína. Tras la microinyección, se realizó el mismo protocolo de estimulación eléctrica de NI.

En todos los casos estudiados ($n = 5$), la potencia media del theta hipocámpico no mostró incremento significativo tras la aplicación del pulso en NI ($Z = -0.67$, $p > 0.05$). La figura 42C ilustra la falta de cambios en la potencia espectral theta de la señal LFP de hipocampo. Se estudió la posible preferencia de fase de los diferentes pulsos alineados y no se observaron distribuciones preferentes tras la estimulación por pulsos (test de Rayleigh, $p > 0.05$; figura 43C). En resumen, la activación de NI es capaz

de producir un reinicio en la oscilación theta de hipocampo por medio de sus proyecciones sobre MS/DB.

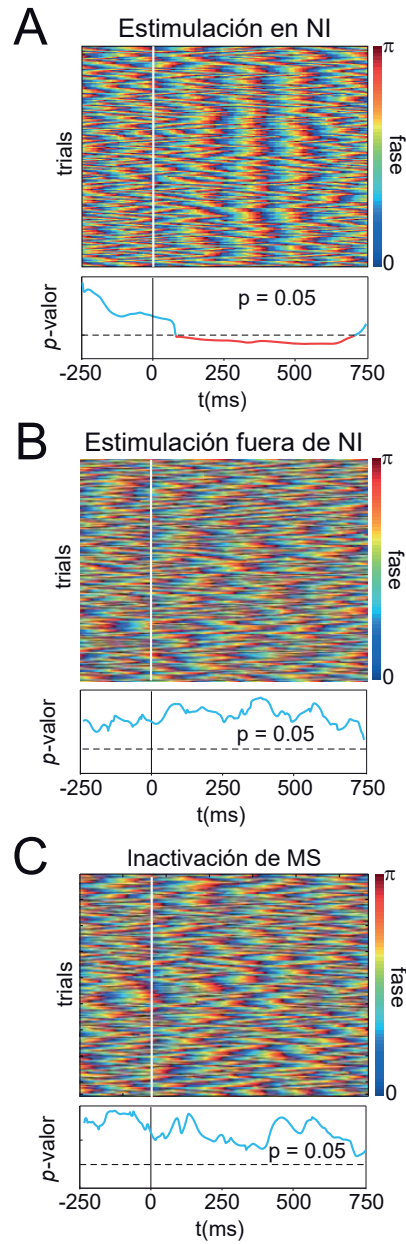


Figura 43: Efecto de la estimulación de NI sobre las fases del theta de hipocampo. **A.** Arriba, reinicio de la fase theta producida por un único pulso eléctrico en NI (línea vertical blanca). Cada línea horizontal refleja las fases de la señal theta de hipocampo. Los colores cálidos representan el pico de la fase. Abajo, representación temporal del test de Rayleigh para la distribución de fases, para los ensayos dentro de una sesión de registro. Los valores (en rojo) bajo el umbral de significación (línea horizontal, $p < 0.05$) permitieron calcular el inicio y la duración del reinicio del theta hipocámpico. **B** y **C** Representan las fases de los ensayos (arriba) y su correspondiente test de Rayleigh (abajo) para estimulaciones eléctricas en zonas vecinas a NI y tras la inhibición de MS/DB, respectivamente.

DISCUSIÓN

Este trabajo se basa en el hecho de que el NI constituye un nodo central en la activación del sistema septohipocámpico. Previamente, se había podido determinar su posición clave en el circuito de control del ritmo theta hipocámpico (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008; Cervera-Ferri et al., 2012). Además, se había puesto de manifiesto su relevancia para la generación de dicha oscilación (Núñez et al., 2006) y la existencia de una oscilación theta local en el propio NI en ratas anestesiadas con uretano (Cervera-Ferri et al., 2011).

El planteamiento del estudio fue determinar la relación que grupos de neuronas, implicados en estados particulares de activación, mantienen con el hipocampo en los periodos de actividad theta. En general, la pregunta que abordamos es cómo los procesos de memoria dependientes de hipocampo pueden ser reclutados ante la activación de un sistema neural específico que inicie la entrada en un estado funcional del sistema nervioso que requiera la participación hipocámpica. En este sentido, el núcleo incertus está integrado en una red neural cuyos nodos son los responsables de iniciar y modular la actividad theta en el hipocampo (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). La cuestión concreta que planteamos en esta Tesis fue qué papel concreto juega el NI en esta red.

Los datos muestran que el propio NI mantiene una actividad theta altamente acoplada a la registrada en hipocampo. Esta actividad presenta una direccionalidad dominante, con el predominio de un flujo de información ascendente tras la activación colinérgica de la formación reticular. Dado que esta actividad theta registrada en NI podría ser debida únicamente a la influencia de las aferencias de NI, en experimentos posteriores hemos demostrado que el propio núcleo contiene neuronas con actividad theta capaces de generarla y que permiten predecir la actividad hipocámpica. En este trabajo se ha descrito un nuevo grupo de neuronas en NI, las denominadas neuronas tipo III, con una actividad de disparo regular en el rango theta y altamente acoplada a la activación de la oscilación theta del hipocampo. Este grupo neuronal mantiene su actividad en momentos de alto grado de

activación hipocámpica, lo que, sumado a los máximos niveles de acoplamiento al inicio de la estimulación, sugiere un posible papel en el establecimiento o reinicio de la oscilación theta hipocámpica. Este hecho queda demostrado en experimentos en los que pulsos eléctricos reiterados evidenciaron la inducción de ciclos theta en el hipocampo en los que se da un reinicio de sus fases. Con todo ello, a tenor de los resultados, NI parece ser un nodo activador, crucial en el inicio y mantenimiento de la actividad theta hipocámpica.

5.1 ACTIVIDAD NEURONAL DEL NÚCLEO INCERTUS ACOPLADA AL THETA HIPOCÁMPICO

A pesar de la gran cantidad de estudios referentes a oscilaciones cerebrales, todavía no se conoce exactamente el papel que juegan estos fenómenos en la computación nerviosa. Se postula que podrían estar ligados a la codificación del entorno, al acoplamiento de la actividad de distintas poblaciones neuronales y a la regulación del tránsito de información en el encéfalo (Buzsáki, 2004; Sejnowski y Paulsen, 2006). Al igual que otros muchos procesos biológicos, los ritmos cerebrales parecen ser un fenómeno ubicuo (Buzsáki et al., 2013). La conservación de este mecanismo como sistema de computación se explica analizando el gasto energético necesario para llevar a cabo el trasiego de datos entre los distintos nodos osciladores. Al igual que la teoría de circuitos trata de determinar y optimizar la energía consumida por un sistema electrónico, los procesos oscilatorios neurales se presentan como las herramientas de la comunicación cerebral que minimizan el consumo energético mediante el aprovechamiento de la arquitectura cerebral (Laughlin y Sejnowski, 2003). Dicho de otra forma, las oscilaciones cerebrales suponen un eficaz sistema de transferencia de información con un bajo coste metabólico, a través de acoplamientos entre sus actividades neuronales.

Las oscilaciones encefálicas representan, en última instancia, el acoplamiento temporal de la actividad conjunta de un complejo neuronal distribuido. Así como las oscilaciones pueden proporcionar una organización temporal potencialmente útil en el procesamiento dentro de una región, también pueden apoyar el procesamiento interregional eficiente. Por tanto, si el procesamiento está organizado temporalmente en tramos, pero se extiende a través de dos regiones cerebrales, entonces se requiere una organización temporal coherente en ambas regiones. Por ejemplo, si el procesamiento se organiza de tal manera que la información relativa a diferentes *inputs* sensoriales se produce en diferentes ciclos de una oscilación, y esta información se extiende a través de múltiples regiones del cerebro, entonces los

ritmos locales deben ser coherentes para mantener las fijaciones correctas de los inputs. Igualmente, si la actividad neuronal en dos regiones tiende a oscilar, el acoplamiento de la actividad en ambas regiones a través de la transmisión sináptica interregional tenderá a conducir a la coherencia en las oscilaciones locales. Este punto de vista, de la coherencia oscilatoria como diagnóstico del acoplamiento funcional interregional, se elabora en la hipótesis de la «comunicación a través de la coherencia» (Fries, 2005).

De esta forma, el ritmo theta hipocámpico es el reflejo de la sincronización entre los distintos nodos de una red encargada del procesamiento mnemónico (Colgin y Moser, 2009). Esta red se compone de numerosos núcleos emplazados a lo largo de toda la topografía encefálica: cortezas límbicas (Mitchell y Ranck, 1980; Alonso y García-Austt, 1987a,b), el complejo septal (Stewart y Fox, 1990a,b; Barrenechea et al., 1995; Brazhnik y Fox, 1997; Vinogradova et al., 1998; Wang, 2002; Nerad y McNaughton, 2006; Hangya y Borhegyi, 2009), núcleos hipotalámicos (Kirk et al., 1996) y numerosos lugares del tronco del encéfalo (Faris y Sainsbury, 1990; Kocsis y Vertes, 1992; Simões et al., 1996; Fonoff et al., 1999; Bassant y Poindessous-Jazat, 2001; Ma et al., 2013). Según el modelo más aceptado, el control exógeno de la oscilación theta hipocámpica se encontraría en el tronco del encéfalo, el cual activaría regularmente al complejo septohipocámpico. De entre los núcleos reticulares encargados de la activación theta hipocámpica, el RPO ha sido descrito como un eficaz activador hipocámpico (Klemm, 1972; Macadar et al., 1974; Núñez et al., 2006), mientras que el núcleo del rafe mediano se ha caracterizado como un inhibidor de la ritmicidad theta (Assaf y Miller, 1978; Maru et al., 1979). No obstante, numerosas estructuras parecen implicadas en dicho sistema.

5.1.1 *El núcleo incertus como activador de la red theta hipocámpica*

En los últimos años, el núcleo incertus ha ganado importancia como uno de los nodos capaz de activar las ondas theta del hipocampo. Nuestro grupo demostró que tanto la estimulación eléctrica como química de NI son capaces de generar la aparición de una marcada oscilación theta en hipocampo (Núñez et al., 2006). De esta manera, se demostraba la existencia de una conexión funcional entre el núcleo incertus y el hipocampo, en contraste con los datos que no indicaban la conexión anatómica entre ambas regiones (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). La descripción de las conexiones del núcleo incertus hacían ver que este grupo de neuronas se relacionaba, no con el

hipocampo, sino con la extensa red de áreas subcorticales que iniciaban y modulaban las oscilaciones theta en el hipocampo.

En un artículo posterior, se pudo observar la presencia de una actividad sincrónica a frecuencias theta entre hipocampo y NI, tras la estimulación eléctrica y colinérgica de la región pontina (Cervera-Ferri *et al.*, 2011). Se ponía así de manifiesto la existencia de ritmicidad theta en el núcleo incertus en consonancia con la activación hipocámpica. No obstante, debe reconocerse que los potenciales de campo locales reflejan la actividad conjunta de los potenciales de acción del área de registro y, con mayor peso, de los potenciales postsinápticos con origen en sus aferencias. Por ello, en dicho trabajo se planteó la posibilidad de que la actividad registrada en NI proviniera del sumatorio de las aferencias desde RPO o el propio complejo septal (Goto *et al.*, 2001; Olucha-Bordonau *et al.*, 2003; Teruel-Martí *et al.*, 2008). El MS/DB está considerado el «marcapasos» de la oscilación theta hipocámpica (Petsche y Stumpf, 1962; Gogolák *et al.*, 1968; Gaztelu y Buño, 1982; Alonso y García-Austt, 1987a,b), por lo que parecía lógico pensar que pudiese realizar una función sincronizadora sobre otros núcleos de la red extensa relacionada con el ritmo theta y que, finalmente, pudiese promover la aparición de dicha oscilación en NI. No obstante, en el presente estudio se ha podido determinar la presencia de actividad neuronal theta propia en NI capaz de predecir la oscilación registrada en hipocampo, lo que otorgaría al núcleo incertus una mayor relevancia en la generación de actividad theta hipocámpica.

En el trabajo de Núñez *et al.* (2006) se caracterizaron dos tipos neuronales en el núcleo incertus: las neuronas tipo I, de actividad no rítmica con disparo en rango theta, y las tipo II, neuronas rítmicas con tasa de disparo en el rango beta.

Mediante los estudios de conectividad de NI (Goto *et al.*, 2001) se postuló su posible implicación en la modulación de diferentes estados de activación del animal. Junto con numerosas estructuras reticulares, el NI forma parte del llamado sistema reticular activador ascendente, responsable del grado de activación encefálica (Moruzzi y Magoun, 1949; Brodal y Rossi, 1955). Se ha descrito que el NI está implicado en el sistema de *arousal*, al estar interconectado con diversos núcleos de la formación reticular encargados de la modulación del estado de activación del animal (Moruzzi y Magoun, 1949), además de presentar proyecciones sobre el núcleo laterodorsal tegmental, el rafe dorsal, el área ventral tegmental, la *substantia nigra* y el área lateral hipotalámica (Swanson, 2000; Jones, 2005; Pfaff *et al.*, 2008). En su trabajo de 2001, Goto *et al.* propusieron la posible participación del NI en la modulación de las respuestas frente a estímulos rele-

vantes, basándose en el patrón de conexiones, su posición dentro del tegmento pontino y la sensibilidad a la CRH.

5.1.2 *Extendiendo la clasificación de las neuronas del núcleo incertus*

Uno de los principales resultados del presente trabajo es el haber evidenciado la presencia en NI de neuronas rítmicas a frecuencia theta en condiciones de activación hipocámpica. Estas neuronas, nombradas como tipo III, se encuentran activas tanto en condiciones de theta hipocámpico espontáneo, como el inducido por estimulación sensorial mantenida o por estimulación eléctrica de larga duración de RPO. Adicionalmente, la caracterización electrofisiológica de las neuronas del núcleo incertus, mostró la actividad theta irregular de neuronas tipo I que, tras la estimulación, disparan en un rango de frecuencias superior al theta. De nuevo pudimos confirmar la presencia neuronas tipo II, una subpoblación celular con actividad beta regular tanto en condiciones basales como durante las estimulaciones. El hecho de que todas las neuronas de NI presenten una actividad dependiente de la presencia de theta en hipocampo sugiere que el NI podría ser una puerta de entrada a la activación de la red theta hipocámpica. Adicionalmente, la correlación de la dinámica regular de disparo de las neuronas tipo III del NI con la actividad theta registrada en hipocampo, sugieren que el NI no sólo muestra actividad neuronal dependiente de la presencia de theta, sino que participa activamente de este proceso oscilatorio.

Basándose en sus conexiones, Goto *et al.* (2001) discutió la posibilidad de que el NI fuera una estructura capaz de adaptar las funciones cognitivas al estado comportamental del animal. Esta capacidad de adaptación fue revisada por Ryan *et al.* (2011), en relación a la activación del NI en situaciones de estrés neurogénico y activación dependiente del estado del animal. Como se ha explicado en la introducción, existen numerosos correlatos comportamentales que ponen de manifiesto la relación entre la actividad theta y los estados atencionales (Kemp y Kaada, 1975; Sainsbury y Montoya, 1984; Sainsbury *et al.*, 1987; Jones, 2003). Las neuronas del NI concentran la mayor parte de las fibras provenientes de RPO y, además, son uno de los principales relevos hacia el sistema septohipocámpico (Teruel-Martí *et al.*, 2008). El hecho de que neuronas, que en situación basal se encuentran silentes en NI, se movilizan en respuesta a una activación reticular mantenida, podría contribuir a iniciar un periodo de actividad theta en el sistema septohipocámpico en condiciones de alta carga atencional, como sería el caso de la exposición a estresores. El elevado nivel de activación de las neuronas tipo III ante estimulaciones mantenidas puede implicar que esta población

neuronal responda ante *inputs* relevantes, como los presentes en situaciones de estrés (Banerjee et al., 2010; Ma et al., 2013), contribuyendo así a la respuesta hipocámpica de procesamiento de información.

5.1.3 *Las neuronas tipo III están altamente acopladas a la oscilación theta hipocámpica*

Nuestros resultados sugieren que hay una clara correlación entre la actividad individual de las neuronas de NI y los períodos de activación hipocámpica en el rango de las frecuencias theta. Las neuronas tipo I presentaron una alta probabilidad de trabajar en frecuencias theta durante periodos basales con escasa presencia de ondas theta en el hipocampo. Por su parte, las neuronas tipo II mostraron unas tasas de disparo lejos de las frecuencias theta pero con cambios en el mismo rango beta ante la presencia de oscilaciones theta en el hipocampo. Fueron, sin embargo, las neuronas tipo III las que mostraron mayor propensión a trabajar en el rango theta en los estados de activación del hipocampo, siendo esta relación indicativa de una conectividad funcional entre ambas estructuras (Varga et al., 2008). Por tanto, este resultado es indicativo de una relación directa entre este grupo neuronal y la activación septohipocámpica, siendo las neuronas tipo III de NI participantes activas del circuito de generación de la actividad theta hipocámpica.

Adicionalmente, se observó que las neuronas tipo III obtuvieron altos valores de acoplamiento de fase con la señal hipocámpica en el rango de frecuencias theta. Específicamente, los máximos de acoplamiento se encontraron al inicio y final del estímulo sensorial. De hecho, al inicio de la estimulación se registro un máximo en la tasa de disparo y regularidad de la actividad neuronal. El acoplamiento disminuyó durante el estímulo, pese a ser aún superior al estado basal, para aumentar de nuevo en la finalización del estímulo. Estos niveles de acoplamiento podrían constituir un mecanismo de modulación de fase de la oscilación theta y ser indicativos de los cambios de estado (Oprisan et al., 2014; Voloh y Womelsdorf, 2016).

5.1.4 *Las neuronas del núcleo incertus proporcionan un amplio rango de respuestas dependientes del estado de activación del cerebro*

Los resultados expuestos ponen de manifiesto la activación diferencial del NI puede contribuir a la modulación del procesamiento hipocámpico, dependiente de la presencia de estímulos particulares y de su potencia. En este sentido, se ha descrito la relevancia de la sincronización theta en respuesta a la intensidad

de estímulos nocivos (Bienvenu et al., 2012). Uno de los estímulos empleados en este trabajo, el *tail pinch*, podría suponer estrés o dolor para el animal. Según la descripción llevada a cabo por Ma et al. (2013), la mayoría de las neuronas del NI que se activan ante un estímulo relevante, en su caso una infusión de CRH, se correlacionan con la actividad theta hipocámpica. Por ello, la respuesta de las neuronas del núcleo incertus parece estar relacionadas con la activación estado-dependiente del hipocampo. El que la activación de las neuronas tipo III del NI también se encuentre ante la estimulación de RPO implica que el sistema de activación del hipocampo parta del tronco del encéfalo, posiblemente como integrador de estímulos con suficiente relevancia como para movilizar al sistema límbico.

La contribución directa del NI como un nodo relevante en la integración de sistemas sensoriales o cognitivos y, particularmente, en estados derivados de la presencia de estresores, ha sido postulada por numerosos autores (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Núñez et al., 2006; Teruel-Martí et al., 2008; Banerjee et al., 2010; Cervera-Ferri et al., 2011, 2012; Ryan et al., 2011; Ma et al., 2013). Este núcleo presenta una elevada expresión de receptores para la hormona liberadora de corticotropina (Potter et al., 1992, 1994; Chalmers et al., 1994), lo que lo hace particularmente sensible a diferentes estresores (Bittencourt y Sawchenko, 2000; Passerin et al., 2000; Singewald et al., 2000; Tanaka et al., 2005; Banerjee et al., 2010; Lawther et al., 2015) y a situaciones de elevada activación (Ryan et al., 2011; Ma et al., 2017). Concretamente, se ha visto que el NI muestra la mayor expresión tegmental de receptores tipo 1 de CRH (Potter et al., 1992, 1994; Chalmers et al., 1995) activándose, por tanto, tras la infusión intraventricular de CRH (Bittencourt y Sawchenko, 2000) o ante situaciones de estrés (Banerjee et al., 2010).

Los estudios de Ma et al. (2013) con registros en *slices* de NI, arrojaron luz sobre la posible neuroquímica de las neuronas identificadas como tipo III en el presente estudio. El patrón de disparo de las neuronas tipo III es, en ciertos aspectos, similar al observado para las neuronas relaxina-3 positivas del NI. En su experimento, Ma observó que todas las neuronas relaxina-3 positivas expresaban el receptor tipo 1 para CRH y, además, exhibían acoplamiento de fase al theta hipocámpico en respuesta a la CRH, mientras que las neuronas relaxina-3 negativas no mostraban dicho acoplamiento. Cabe recordar que algunas de las neuronas del NI que proyectan sobre el complejo septal, presentan el transportador vesicular de glutamato VGLUT-2 (Cervera-Ferri et al., 2012), si bien es verdad que la mayoría de neuronas del núcleo incertus son GABAérgicas, expresando GAD 65/67 y una, o ambas, proteínas de unión al calcio calbindina o calre-

tinina y colinoceptivas no-colinérgicas (Olucha-Bordonau et al., 2003). Estas neuronas no se distribuyen de forma homogénea ya que, mientras las calbindina positivas se encuentran por todo el NI, la calretinina solo se expresa en las neuronas de la *pars compacta* medial del NI. Ya que, únicamente las neuronas relaxina-3 positivas mostraron acoplamiento al theta y que la mayor parte de éstas son GAD positivas (Ma et al., 2007), se puede hipotetizar que las neuronas tipo III del NI, las únicas que presentaron acoplamiento al ritmo theta hipocámpico, sean relaxina-3 positivas y, por tanto, neuronas GABAérgicas y CRH-R1 positivas. En el estudio de Ma et al. (2013) también se vio que el 79 % de las neuronas registradas en los *slices* fueron activadas por CRH, proporción similar a la suma de neuronas tipo I y III de nuestro trabajo. Sin embargo, todas las neuronas registradas en este estudio fueron activadas por estimulación de RPO, sensorial o durante periodos de theta espontáneo. La duración de los disparos neuronales registrados es similar a la descrita por el grupo de Ma que, al igual que nosotros, no encontraron diferencias estadísticas en la duración de las espigas entre los distintos grupos celulares.

5.2 EL ACOPLAMIENTO ENTRE EL NÚCLEO INCERTUS Y EL HIPOCAMPO DEMUESTRA SU CONECTIVIDAD EFECTIVA

Utilizando el análisis de acoplamiento entre señales LFP, el presente estudio reveló una relación dinámica entre NI y el sistema septohipocámpico con cambios en los parámetros de sincronización que sugerían que las neuronas de NI podrían conducir efectivamente a las oscilaciones de theta en el hipocampo. Esta sincronización basada en las diferencias de fase de ambas señales marcaba claramente la presencia de un acoplamiento, a pesar de que sus amplitudes pudiesen no estar correlacionadas. Sin embargo, la primera pista que nos llevó a pensar en una direccionalidad preferente fue la de observar un retraso en las fases. La interacción entre fuentes neuronales produce una relación de coherencia de fases en un valor alrededor de 0 y 2π . Se puede utilizar este hecho para estimar la existencia de interdependencia con un cierto retraso temporal. No obstante, esta medida no resulta concluyente por la incertidumbre implícita que conlleva el comportamiento oscilatorio de este tipo de señales.

Al hilo de este enfoque se puede señalar la importancia del orden temporal de los sucesos para poder deducir relaciones causales. Con este argumento, Wiener (1956) propuso la causalidad en términos estadísticos como sigue: supongamos que hay dos magnitudes variables en el tiempo, x e y , que son medidas simultáneamente; si al tratar de predecir el futuro de x incorporando

información del pasado de y , la predicción es mejor que usando únicamente información del pasado de x , entonces se puede decir que hay una relación causalidad de la segunda sobre la primera ($y \rightarrow x$). Esta definición no tuvo formulación matemática hasta que Granger la formalizó en el contexto de modelos regresivos lineales (Granger, 1969).

La causalidad de Granger ha adquirido gran importancia como método analítico durante los últimos años, en parte debido a que es aplicable en gran cantidad de disciplinas (Ding et al., 2006; Bressler et al., 2008; Deshpande et al., 2010; Hwang et al., 2010; Schippers et al., 2010; Bressler y Seth, 2011; Jiao et al., 2011; Luo et al., 2011; Ge et al., 2012). Esta aproximación analítica se presenta como una herramienta indispensable cuando deseamos conocer el sentido del flujo de información en un grupo de nodos interconectados (Granger, 1969; Ding et al., 2006; Seth y Edelman, 2007). En nuestros experimentos, se empleó la causalidad de Granger para probar la hipótesis de que las señales acopladas de hipocampo y NI presentaban un flujo causal preferencial o, atendiendo a la definición misma de causalidad, si una de las señales es capaz de predecir a la otra.

5.2.1 *El núcleo incertus es indispensable para la generación sensorial de ritmicidad theta en el hipocampo*

Habiendo demostrado proyecciones directas del NI sobre aquellos núcleos que inician y modulan el ritmo theta del hipocampo, una de las primeras preguntas que se plantean es si aquellas estimulaciones que son capaces de evocar las ondas theta son dependientes del NI.

Anteriormente, nuestro laboratorio había estudiado los efectos de la estimulación eléctrica de RPO tanto tras la lesión electrolítica, como tras la inhibición farmacológica por infusión del agonista GABAérgico muscimol del NI (Núñez et al., 2006). En ambos casos se observó que la potencia de la actividad theta evocada en hipocampo por la estimulación eléctrica de RPO no superaba los niveles basales. Esto hizo pensar que el NI se encuentra especialmente implicado en la vía de generación del ritmo theta que, desde una de las vías colinérgicas del troncoencéfalo, es capaz de activar al hipocampo.

El RPO es un núcleo clave para la generación de actividad theta en el hipocampo, ya que su activación lleva a un estado theta sostenido en el hipocampo. Inicialmente, se pensó que esta influencia se debía a sus proyecciones sobre las regiones subcorticales que modulan la ritmicidad theta en la región hipotalámica posterior, a través de sus eferencias sobre el núcleo supramamilar y el núcleo posterior hipotalámico (Vertes, 1992; Bocian y

Konopacki, 2001). Sin embargo, nuestro grupo demostró que la principal ruta de activación de RPO sobre el MS/DB es a través de neuronas de NI (Teruel-Martí et al., 2008). Adicionalmente, RPO recibe su principal aferencia del núcleo colinérgico PPT (Grofova y Keane, 1991; Takano y Hanada, 2009), una estructura muy activa frente a estados de elevado *arousal* y durante la fase REM del sueño (Steriade et al., 1990). Se ha visto que las neuronas de PPT responden a diferentes modalidades de estimulación sensorial, incluido el *tail pinch* (Koyama et al., 1994), y que, adicionalmente, la inyección de procaina en PPT es capaz de eliminar el theta evocado por *tail pinch* (Nowacka et al., 2002). Poniendo en conjunto esta información, podemos pensar que en estados de atención elevada, ya sea por entrada sensorial durante la vigilia o por reactivación de las neuronas colinérgicas de PPT, se activa la vía RPO hacia NI, actuando éste último sobre el circuito de control hipocámpico a través de sus conexiones con el septum medial, el núcleo supramamilar y el núcleo del rafe mediano, induciendo, en última instancia, la actividad theta en el hipocampo.

5.2.2 *Acoplamiento oscilatorio entre hipocampo y núcleo incertus*

Nuestro grupo describió con anterioridad la existencia de actividad theta en NI, la cual se sincroniza con el hipocampo tras la estimulación colinérgica o eléctrica de la formación pontina (Cervera-Ferri et al., 2011). En aquel estudio, un resultado sorprendente fue que la estabilización en theta del NI se produjera antes que la del hipocampo, tras la infusión de carbacol. Este resultado nos llevó a plantearnos la posible dinámica temporal de las actividades oscilatorias de NI e hipocampo. Para ellos, se empleó el mismo paradigma de infusión de carbacol en RPO en animal anestesiado, a fin de conseguir una sincronización rítmica de larga duración que nos permitiera elucidar el acoplamiento temporal de ambas actividades y, en última instancia, la posibilidad de una relación causal.

Los resultados del estudio indicaron la existencia de un acoplamiento temporal de la actividad de un núcleo del sistema reticular ascendente, el NI, con la oscilación hipocámpica. Este acoplamiento se logró tras la activación colinérgica de la formación reticular pontina, proceso que, de forma fisiológica, ocurre en estados de elevada carga atencional de la vigilia y durante el sueño REM (Newman et al., 2012). Los resultados obtenidos aportan información al respecto de lo que puede ocurrir en tales estados, donde el hipocampo se encuentra participando activamente en procesos relacionados con la memoria. Estos procesos no solo dependen del hipocampo, sino que incluyen a una ex-

tenza red distribuida de estructuras encefálicas (Squire, 2004). Las oscilaciones theta juegan un papel clave en la sincronización del circuito neuronal subyacente a la memoria (Sarnthein et al., 1998; Sauseng et al., 2004). En este sentido, numerosos estudios promueven que el acoplamiento de fases en theta, entre las distintas áreas, permite la comunicación mediante la coherencia (Klimesch et al., 2008; Fell y Axmacher, 2011). Se cree que este efecto de sinergia se produce debido al establecimiento temporal de complejos neuronales locales en diferentes regiones cerebrales (Eckhorn et al., 1988; Gray et al., 1989; Fries, 2005; Cavannah et al., 2010). De esta manera, el acoplamiento de fases en frecuencia theta ha demostrado ser un mecanismo necesario para la función cognitiva en circuitos córtico-corticales (Polanía et al., 2012), córtico-hipocampales (Miller et al., 1991; Bontempi et al., 1999; Poch et al., 2011) y subcórtico-hipocampales (Young y McNaughton, 2009; Lesting et al., 2011). Por todo ello, el acoplamiento de fase de la actividad del NI con la oscilación theta hipocámpica permitiría integrar la información aportada por el NI al circuito global.

5.2.3 Causalidad entre el hipocampo y el núcleo incertus

Si bien la información del acoplamiento proporciona una idea de la relación existente entre el NI y el hipocampo, no nos ofrece detalles de la direccionalidad de esta relación. El análisis de causalidad en los registros del potencial de campo mostró que, en condiciones basales, el hipocampo muestra oscilaciones independientes y desacopladas de las registradas en el núcleo incertus. Sin embargo, durante cortos periodos de theta espontáneo, se pudo vislumbrar un vago efecto causal. Únicamente cuando las señales mostraron alta coherencia, las señales dieron signos de causalidad entre ellas. El principal resultado del estudio fue que durante los periodos de theta evocado, la señal procedente de NI contenía información suficiente para predecir a la señal de hipocampo. Este resultado sugiere que, en estas condiciones, las oscilaciones theta presentes en el NI conducen a la activación de la ritmicidad theta del sistema septohipocámpico. Sin embargo, los mismos cálculos llevaron a detectar cortos periodos de causalidad alterna. Nuestros datos soportan la idea de una regulación theta troncoencefálica dependiente de acetilcolina que coexiste con tramos de *feedback* de control hipocámpico.

No obstante, aprovechando el perfil electrofisiológico del experimento de caracterización neuronal, se llevó a cabo un análisis de la causalidad para cada una de las poblaciones neuronales encontradas en el NI. Al igual que en el caso de los registros del potencial de campo, no se observaron medidas de causali-

dad claras en las condiciones basales, en las que sólo aparecen pequeños episodios theta. Sin embargo, con la aparición de las oscilaciones theta en hipocampo se pudieron definir claras interacciones causales. El hallazgo de que la actividad de las neuronas tipo III en las frecuencias theta contiene información capaz de predecir futuros patrones oscilatorios en el sistema septohipocámpico durante la ritmicidad theta evocada es particularmente interesante, si bien es verdad que, durante cortos periodos de tiempo, el sentido causal se revierte, siendo el hipocampo quien prevé la actividad de las neuronas tipo III de NI. Este resultado concuerda con lo observado en el estudio de causalidad de señales de campo y, además, demuestra un origen endógeno de la actividad theta encontrada en el NI. Por su parte las neuronas tipo I y II mostraron causalidad predominante en el sentido HPC→NI en la banda de frecuencias de 10-20 Hz. Estos datos sugieren que con la activación sensorial, una entrada ascendente de NI, dirigida por las neuronas tipo III, efectivamente condujo el sistema septohipocámpico en la codificación theta. Sin embargo, estas épocas propensas se alternaron con periodos breves de ritmo theta hipocámpico para reclutar neuronas NI. Además, las diferentes poblaciones de neuronas en el NI mostraron una clara preponderancia de direccionalidad (figura 44).

Estos resultados son coherentes con la posición del NI en la ruta de generación del theta. Como se ha comentado anteriormente, el NI es el nodo principal entre el RPO y el marcapasos del theta hipocámpico, el septum medial (Teruel-Martí et al., 2008). Un estudio reciente sobre conectividad recíproca, ha mostrado una marcada proyección ascendente desde el NI hasta la porción ventral de la banda diagonal de Broca en el septum medial, complementada por una proyección recíproca menor (Sánchez-Pérez et al., 2015). Este bucle asimétrico podría ser el sustrato anatómico funcional de los datos observados en los estudios de causalidad. Mientras las neuronas tipo III de NI serían las responsables de la proyección ascendente al septum medial (largos tramos de causalidad NI→HPC en banda theta), las tipo I y II serían buenas candidatas para la proyección recíproca (intrusiones de causalidad HPC→NI).

Tomados en conjunto, estos datos confieren un nuevo nivel de explicación al estado de las oscilaciones theta acopladas entre el NI y el hipocampo bajo activación sensorial. En esta situación, nuestro análisis reflejó un ciclo dinámico NI-hipocampo, entendido como las influencias causales que las poblaciones neuronales en un área cerebral ejercen sobre las de otra. Dado el patrón de las ondas theta, ambas áreas mantuvieron un acoplamiento bidireccional con un flujo ascendente predominante, junto con épocas cortas acompañantes en la direccionalidad causal inver-

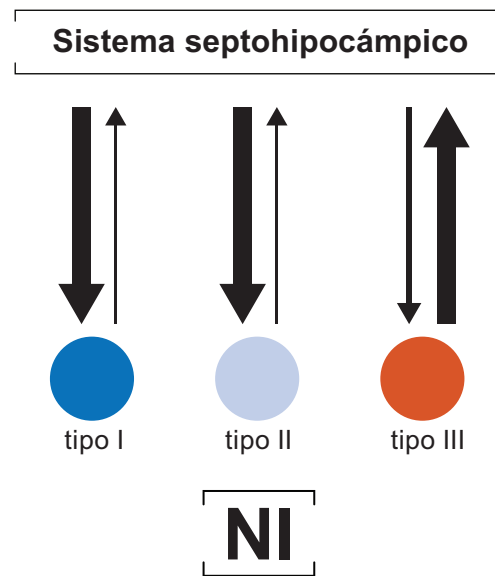


Figura 44: Diagrama esquemático de las interacciones causales entre las neuronas del NI y el sistema septohipocámpico. El grosor de las flechas refleja el flujo causal principal durante los periodos de actividad theta.

sa. La dinámica de la alternancia de flujo podría explicar las microperturbaciones del ritmo theta en curso. Esta idea sugiere el papel potencial del NI como un actor activo en el estado theta, y no como un conductor o iniciador estricto de la ritmicidad del hipocampo.

5.3 REINICIO DE LA FASE DEL RITMO THETA HIPOCÁMPICO TRAS LA ESTIMULACIÓN DE NÚCLEO INCERTUS

Finalmente se decidió estudiar la forma en que el NI es capaz de interactuar con el hipocampo. El ordenamiento o la alineación de las fases a los estímulos con elevada *saliencia* favorece su codificación y la transmisión de información comportamental relevante (Vолоh y Womelsdorf, 2016). Puesto que el NI es candidato a transmitir información relativa a la entrada de un estímulo relevante, o un estresor, se analizó la posibilidad de que su activación indujera un reinicio de la fase de la onda theta hipocámpica. Para ello se llevaron a cabo experimentos de estimulación eléctrica en NI, a fin de observar la microestructura de las oscilaciones theta en hipocampo evocada por la activación de NI. En este experimento no era tan importante obtener un theta mantenido en el tiempo, sino observar las alteraciones locales que se

producían en el devenir de los ciclos theta del hipocampo. EL efecto de los estímulos repetidos desde NI fue el reiniciar la fase de las ondas theta, independiente del estado previo al estímulo. Numerosos trabajos han mostrado que la estimulación eléctrica de MS/DB es capaz de reiniciar la actividad theta de hipocampo (Buño et al., 1978; García-Sánchez et al., 1978). Este fenómeno se describió incluso estimulando parte de sus aferencias, incluyendo la formación reticular (Gaztelu y Buño, 1982) y el fascículo medial prosencefálico (Brazhnik y Vinogradova, 1988). Gaztelu y Buño (1982) probaron que el reinicio de la fase del ritmo theta hipocámpico se debía al acoplamiento de fase con el septum medial. Estos autores describieron un grupo de neuronas septales, denominadas tipo 1, consideradas el marcapasos de la actividad theta hipocámpica, las cuales eran responsables de inducir un reinicio en la fase theta de hipocampo.

Estos datos, sumados al patrón de conexiones del NI, sugieren que el reinicio de la fase theta de hipocampo mediante la estimulación eléctrica del NI implica, necesariamente, al complejo septal. La prueba de que este efecto de reinicio de la fase se daba a través del MS/DB, vino de la inactivación temporal del área septal, al observar que los pulsos eléctricos en NI no eran capaces de afectar al ritmo theta hipocámpico, lo que corroboraba nuestra hipótesis. En términos generales, las neuronas tipo III de NI podrían actuar sobre las neuronas de MS/DB, como por ejemplo sobre las neuronas tipo 1 septales descritas por Gaztelu y Buño (1982), disparando un periodo de actividad theta, iniciado por un reinicio de la fase. Así, la activación reticular del NI podría derivar en una acción marcapasos las neuronas septales encargadas del reinicio de la fase theta hipocámpica, a través de las neuronas tipo III. Por tanto, el reinicio de la fase theta en hipocampo, y el mantenimiento de esta actividad oscilatoria, sería dependiente del NI a través de un relevo septal.

Recientemente se ha probado que la activación optogenética de las neuronas parvalbúmina del MS/DB es capaz de evocar una retroalimentación rítmica con los circuitos hipocámpicos, contribuyendo a la iniciación y mantenimiento de la oscilación theta (Vandecasteele et al., 2014; Bender et al., 2015). En estos trabajos se vio que la estimulación con pulsos ópticos sobre las neuronas parvalbúmina positivas de MS/DB era capaz de reiniciar la fase del ritmo theta hipocámpico. Adicionalmente, se ha visto que una población de neuronas parvalbúmina positivas del MS/DB son indispensables para el mantenimiento de la actividad theta en hipocampo, mediante su patrón de descargas a ráfagas inhibitorias rítmicas a frecuencia theta sobre neuronas de hipocampo (Hangya y Borhegyi, 2009). Estas neuronas parvalbúmina positivas presentan una actividad muy similar a la descrita

por Gaztelu y Buño (1982) en las neuronas tipo 1 septales, con el mismo patrón de disparo y acoplamiento a la oscilación theta hipocámpica. Curiosamente, se ha visto que las neuronas parvalbúmina septales son la diana de proyecciones directas desde el NI (Olucha-Bordonau et al., 2012). Estos resultados refuerzan la idea de que el NI es capaz de reiniciar la oscilación theta hipocámpica mediante sus proyecciones sobre las neuronas parvalbúmina septales, probablemente siendo las neuronas tipo III del NI las responsables de una inhibición rítmica capaz de evocar un patrón de disparo de ráfagas regulares en el MS/DB.

El perfil neuroquímico del NI presenta una gran variedad de neurotransmisores y neuromoduladores, tales como neurotensina, colecistoquinina, ranatensina, relaxina-3 o glutamato (Jennes et al., 1982; Chronwall et al., 1985; Olucha-Bordonau et al., 2003; Tanaka et al., 2005; Ma et al., 2007; Cervera-Ferri et al., 2012). No obstante, la presencia de marcadores GABA en el núcleo incertus (GAD, calretinina y calbindina) indica la existencia de neuronas inhibitorias, algunas de las cuales proyectan al MS/DB (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). Este *input* inhibitorio sobre el MS/DB está en consonancia con el modelo propuesto por Denham y Borisjuk (2000), en el que la descarga inhibitoria sobre las neuronas septales es capaz de sincronizarlas regularmente mediante un mecanismo de reinicio. Este modelo de generación theta describe un bucle hipocampo-septal en el que las ondas theta se mantienen mediante un proceso de reinicio. Así pues, la proyección inhibitoria desde NI sobre las neuronas septales podría explicar el comienzo del theta hipocámpico.

Se han estudiado eventos de reinicio de fase de las ondas theta en hipocampo tras la presentación de un estímulo o mediante la estimulación de las vías aferentes (Brazhnik et al., 1985; Vinogradova et al., 1993; Givens, 1996; Tesche y Karhu, 2000; Williams y Givens, 2003). El reinicio de la fase de sistemas neuronales oscilatorios puede ser entendido como un mecanismo de optimización del procesamiento de la información, mediante el establecimiento de patrones temporales de codificación (Canavier, 2015). Por ello, se ha propuesto que la fase de la actividad theta pudiera suponer una forma de acoplar la actividad hipocámpica a estímulos relevantes (Givens, 1996; Hasselmo, 2007, 2008), de manera que pueda promover el procesamiento cognitivo relativo a estímulos sensoriales capaces de generar actividad theta (Adey, 1967; Givens, 1996; Vinogradova et al., 1996).

Debemos recordar que las oscilaciones cerebrales proporcionan un marco temporal para el procesamiento y transmisión de la información. De esta manera, los eventos neuronales que suceden dentro de los límites de un ciclo oscilatorio, pueden ser interpretados como ensamblajes computacionales (Buzsáki, 2004).

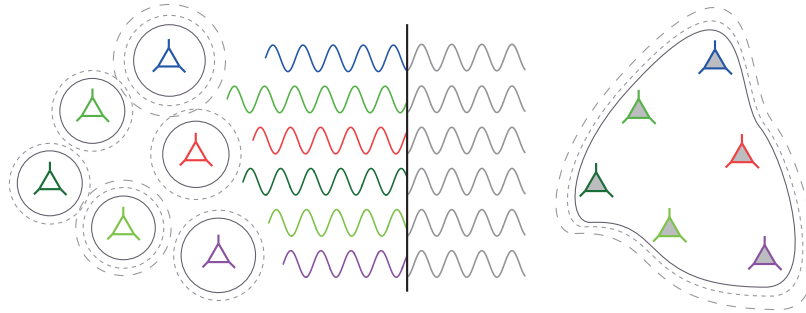


Figura 45: Esquema del acoplamiento de una población neuronal debido al reinicio de la fase. Ante la presencia de un estímulo relevante, la actividad de las distintas neuronas de la estructura sufriría un reinicio (línea negra vertical), acoplando la actividad poblacional y permitiendo una computación global de la información entrante.

En el caso de la entrada de estímulos relevantes para el animal, el reinicio de fase proporcionaría así una parcelación temporal óptima para la codificación de la información mediante el acoplamiento de la población neuronal (figura 45), lo que, en el caso del hipocampo, se traduciría en la creación, consolidación y recuperación de recuerdos (Voloh y Womelsdorf, 2016). De hecho, la plasticidad sináptica se ve facilitada por el reinicio de la onda theta, creando condiciones óptimas para la potenciación a largo plazo de estímulos relevantes (McCartney et al., 2004). Por tanto, nuestros resultados indican que el NI podría ser considerado como un nodo fundamental en la generación de theta hipocámpico en respuesta a estímulos de elevada *saliencia*. Cabe de nuevo retomar la idea de que el NI es un núcleo muy reactivo ante diferentes estresores, en virtud a su sensibilidad a la CRH, siendo dependiente del nivel atencional del animal (Potter et al., 1994; Bittencourt y Sawchenko, 2000; Goto et al., 2001; Banerjee et al., 2010). En este contexto, los resultados permiten sugerir que el NI sería capaz de reiniciar a la oscilación theta hipocámpica en presencia de estímulos altamente relevantes, proveyendo al hipocampo del marco computacional óptimo para el procesamiento de la información relacionada con dichos estímulos.

5.4 FUNCIÓN DEL NÚCLEO INCERTUS

El patrón de conexiones del NI ha sido considerado clave para su participación en múltiples procesos fisiológicos, desde la respuesta al estrés hasta la memoria o el nivel atencional del animal (para revisión, Ryan et al. 2011). Nuestros resultados se pueden interpretar de acuerdo a las funciones atribuidas al NI, expandiendo la comprensión de los mecanismos funcionales subyacentes a su funcionalidad.

5.4.1 *El núcleo incertus y el estrés*

Dada la alta concentración del receptor tipo 1 para la CRH, el núcleo incertus ha sido objeto de estudio en su posible implicación en la vía neural del estrés (Potter et al., 1994; Bittencourt y Sawchenko, 2000; Van Pett et al., 2000; Kumar et al., 2016). La CRH es considerada la principal mediadora de la preparación a la respuesta autónoma al estrés, ya que induce un estado de activación generalizado y produce un incremento de la actividad motora (Sutton et al., 1982; Fisher, 1993; Koob y Heinrichs, 1999). Se ha visto que la administración intracerebroventricular de CRH, o de su agonista urocortina, incrementa marcadamente la expresión de *c-fos* en el NI, así como en otros núcleos subcorticales tales como LDT, PPT o el *locus coeruleus* (Bittencourt y Sawchenko, 2000). Adicionalmente, en un estudio reciente se pudo observar como las neuronas relaxina-3 positivas del NI veían su fase acoplada a la actividad theta hipocámpica tras su estimulación con CRH (Ma et al., 2013).

Se ha discutido ampliamente la fuente de CRH que activa a las neuronas de NI bajo situaciones de estrés. Una teoría apunta a que una situación de estrés sería capaz de fomentar la producción de CRH en el núcleo paraventricular hipotalámico o en la amígdala central, pudiendo llegar al NI mediante el líquido cefalorraquídeo (Swanson et al., 1983) debido a su posición adyacente al cuarto ventrículo (Bittencourt y Sawchenko, 2000; Goto et al., 2001). Adicionalmente, en el tronco del encéfalo se han descrito numerosas poblaciones de neuronas CRH positivas que podrían suministrar este neuropéptido al NI de manera más directa: en el núcleo de Barrington, núcleos del rafe, núcleo laterodorsal tegmental, parabraquial, cuneiforme, locus ceruleus y la mayoría de núcleos centrales sensoriales (Swanson et al., 1983).

A su vez, el NI podría ejercer un papel regulador sobre el circuito del estrés mediante sus proyecciones sobre la amígdala, el núcleo paraventricular talámico y la corteza prefrontal, estructuras implicadas en la adaptación al estrés crónico (Olucha-Bordonau et al., 2003; Dallman et al., 2006). A su vez, sus conexiones recíprocas con el cercano núcleo del rafe dorsal podrían participar en este proceso. La participación de este núcleo en el control del estrés es ambigua, puesto que participa tanto en la activación de la respuesta de estrés como en su cese (Hammack et al., 2002; Robbins). Y en este sentido cabe destacar la relación inversa entre la serotonina y la relaxina-3: existen receptores para serotonina en NI y para relaxina-3 en rafe dorsal y la depleción de serotonina aumenta la expresión de relaxina-3 en NI (Miyamoto et al., 2008). De esta forma, la alteración del sistema serotoninérgico en desórdenes de ansiedad, estrés crónico

y depresión también podría estar relacionada con una alteración complementaria de la actividad de NI.

Numerosos estudios han pretendido dilucidar los estímulos estresores capaces de activar al NI. Usando el marcador de activación neuronal *c-fos* se vió que tras la inyección intraventricular de CRH, el 66 % de las neuronas relaxina-3 positivas de NI se encontraban activadas (Bittencourt y Sawchenko, 2000; Tanaka et al., 2005), resultados muy distinto de los bajos niveles de expresión de *c-fos* encontrados en condiciones basales (Cullinan et al., 1995). Así, la respuesta de NI al estrés parece estar mediada por los receptores CRH-R1 y está ligada a la liberación del neuropéptido relaxina-3 (Burazin et al., 2002; Tanaka et al., 2005; Banerjee et al., 2010). Se ha demostrado que la relaxina-3 es capaz de modular la acción de receptores presentes en estructuras ligadas al estrés y el grado atencional, tales como el bulbo olfatorio, la amígdala, la corteza somatosensorial, el tálamo o los colículos (Sutton et al., 2004). Esto nos lleva a pensar que la liberación de relaxina-3 desde el NI fuera capaz de modular las respuestas sensoriales y reflejas, a fin de mejorar la codificación de la información del entorno en una situación de estrés. Se ha descrito que la inyección de relaxina-3 en el MS/DB induce la generación de actividad theta en el hipocampo (Ma et al., 2009), lo que otorgaría al NI el papel de modulador de la respuesta cognitiva de hipocampo ante situaciones estresogénicas, mediante sus proyecciones sobre el complejo septal.

Entre los agentes estresores que afectan a la actividad del NI, se ha estudiado que la inmovilización prolongada, de mas de una hora de duración, es capaz de incrementar la expresión de *c-fos* en el NI (Senba et al., 1993). También se ha observado activación del NI tras la aplicación de una descarga eléctrica en las extremidades (*foot shock*) del animal (Li et al., 1998), o mediante estímulos dolorosos en extremidades inferiores (Bullitt, 1990; Senba et al., 1993). Se ha visto que el NI de ratas re-expuestas a entornos donde habían experimentado condicionantes aversivos, presenta menores niveles de expresión de *c-fos*. Este resultado sugiere que el núcleo incertus se activa diferencialmente ante situaciones de gran carga atencional durante las situaciones de estrés (Goto, 1998; Goto et al., 2001; Ribeiro-Barbosa et al., 2005). Observaciones de *c-fos* de Goto et al. (2001) demostraron que el NI de ratas entrenadas en un test de natación forzada se encontraba mas activo que en aquellos casos en los que los animales no habían recibido entrenamiento. Las ratas entrenadas para encontrar la plataforma sumergida presentaron mayor expresión de *c-fos* en el NI en ausencia de plataforma que los animales no entrenados. Cabe recordar que el test de natación forzada es una tarea demandante para el hipocampo, ya que activa el pro-

cesamiento espacial (Whishaw y Schallert, 1977; Olvera-Cortés et al., 2004), lo que puede llevar a la aparición de actividad theta hipocámpica.

Debemos recordar que hemos observado acoplamiento entre las actividades oscilatorias del NI y el hipocampo tras activación colinérgica troncoencefálica. Existen numerosas evidencias que otorgan a la acetilcolina un papel señalizador en la respuesta a estrés (Mark et al., 1996; Arnsten, 2009; Tasker y Herman, 2011; Pinard et al., 2012). Bajo estímulos estresores, el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal reciben altos niveles de acetilcolina desde el septum medial (Mesulam, 2005). Curiosamente, la acetilcolina pueda tener un efecto activador de la ritmicidad theta hipocámpica (Fisahn et al., 1998; Drever et al., 2011). Si bien la cantidad de respuestas comportamentales relacionadas con el sistema colinérgico dificulta su estudio en el marco de la modulación del estrés, se postula una idea general sobre su participación a través de las neuronas colinérgicas del tronco del encéfalo. Así, el acoplamiento temporal de las neuronas colinérgicas troncoencefálicas con núcleos del estriado, o septales, facilitarían la asociación de estresores o eventos de elevada *saliencia* a pistas en el entorno, contribuyendo a la generación de respuestas relevantes frente a dichos estímulos (Picciotto et al., 2012). Adicionalmente el NI, no solo presenta la enzima colinacetiltransferasa, sino que recibe proyecciones colinérgicas de LDT, núcleo que, junto con PPT, se encuentra muy activo durante momentos en que el hipocampo presenta predominancia de ondas theta, como la fase REM del sueño o la vigilia activa (Jones y Muthale, 1998). En este sentido, cabe recordar que la infusión de agonistas colinérgicos en RPO, uno de las principales aferencias del NI, son capaces de inducir la generación de ritmicidad theta hipocámpica (Núñez et al., 1991; Vertes et al., 1993) así como inducir a los animales en un estado de fase REM (Bourgin et al., 1995). Así pues, los núcleos colinérgicos troncoencefálicos parecen ser esenciales para la activación hipocámpica en estados de alta presencia de ritmicidad theta. Estas ideas refuerzan nuestro planteamiento de la interacción del NI en los procesos de estrés. La activación colinérgica de este núcleo, principalmente a través de su inervación desde RPO, podría controlar la actividad del MS/DB, reiniciando su actividad para facilitar la asociación de los estímulos desencadenantes de la situación de estrés al marco cognitivo temporal proporcionado por la actividad theta hipocámpica (figura 46). Así, el NI jugaría un papel clave en la modulación de la atención diferencial a estímulos relevantes, lo que desencadenaría un incremento en el procesamiento mnemónico del hipocampo.

Pese a que su papel en el estrés y la ansiedad todavía no se conoce con precisión, recientemente ha sido hipotetizado que este núcleo pueda ser candidato a ser una diana terapéutica en trastornos neuropsiquiátricos. Esta propuesta se basa en la co-localización de receptores CRH-1 con neuronas RLX-3 positivas, selectivas de NI y la evidencia de que la infusión de CRH en NI produce la inactivación de corteza prefrontal medial (Kumar et al., 2016). En cualquier caso, su papel central en el control de la oscilación theta y su sensibilidad tanto a la activación colinérgica como al estrés, podría convertirlo en un núcleo capaz de adaptar el procesamiento hipocámpico en situaciones de atención elevada.

5.4.2 El núcleo incertus y el nivel de activación

El *arousal*, o nivel de activación, se entiende como un estado fundamental definido, comportamentalmente, por un incremento de la alerta ante estímulos sensoriales, un aumento de la actividad motora y una mayor propensión a manifestar respuestas emocionales (Pfaff et al., 2008). Si bien los niveles de *arousal* presentan variaciones circadianas, acoplados al ciclo sueño-vigilia, numerosos elementos, incluidos agentes estresores, pueden incrementar los niveles de activación atencional. Se ha visto que el NI podría ser un buen modulador del nivel de *arousal* debido a su patrón de proyecciones.

Numerosos estudios han mostrado la interconectividad del NI con núcleos implicados en la modulación de los niveles atencionales, incluido el ciclo sueño-vigilia (Swanson, 2000; Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Pfaff et al., 2008). El NI se localiza próximo a la formación reticular, descrita tradicionalmente como parte esencial del incremento del nivel de *arousal* (Moruzzi y Magoun, 1949). Adicionalmente, el NI proyecta sobre estructuras implicadas en la modulación del estado atencional y, algunas de ellas, descritas como participantes activas de la actividad theta. El NI envía proyecciones sobre el rafe mediano, los núcleos interpedunculares, el área preóptica lateral y el núcleo RPO, si bien en este último caso la proyección inversa recíproca es la principal. El núcleo incertus también proyecta sobre núcleos colinérgicos como el LDT, serotoninérgicos como el núcleo del rafe dorsal, dopaminérgicos como el área ventral tegmental, sustancia nigra *pars compacta* y el hipotálamo lateral, los cuales contienen neuronas que expresan neuropéptidos implicados en el *arousal* como la orexina o la hormona concentradora de melanina (Swanson, 2000; Jones, 2005; Pfaff et al., 2008). Existe un elevado grado de interconexión entre los núcleos sobre los que proyecta el NI. Estas estructuras neuronales presentan patrones

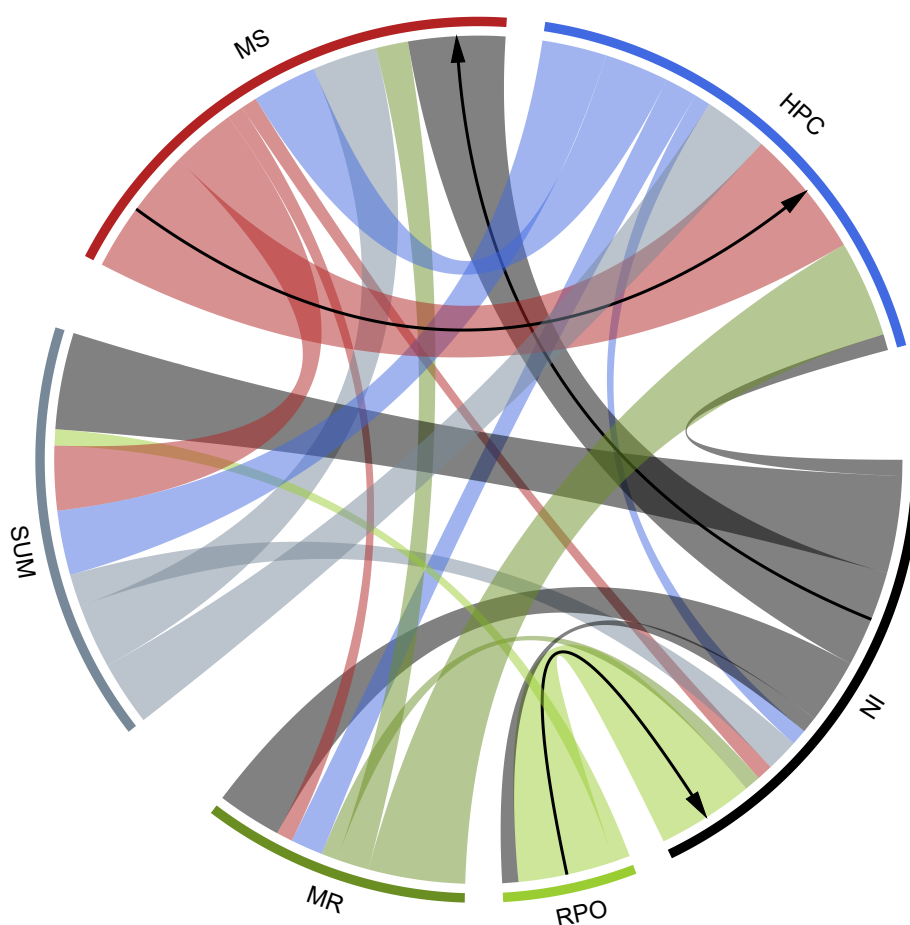


Figura 46: Esquema simplificado de las conexiones anatómicas de la red osciladora theta (en colores) y de la posible vía de generación colinérgica de actividad theta hipocámpica propuesta (flechas negras). El grosor de las líneas representa la densidad de proyecciones de los distintos núcleos sobre el resto.

topográficos de proyecciones complementarias a otras regiones encefálicas (Contestabile y Flumerfelt, 1981; Hayakawa y Zyo, 1984; Groenewegen et al., 1986), por lo que podrían considerarse constituyentes de un sistema coordinado de control del grado de activación del animal mediante la modulación de los distintos nodos del circuito.

La información anatómica, neuroquímica y comportamental, hacen pensar que la función principal del NI sería la de incrementar los niveles de actividad comportamental del animal ante situaciones estresoras o, lo que es lo mismo, claves para la supervivencia. A lo explicado en el apartado del estrés, hay que sumar que se ha visto incremento de expresión de *c-fos* en ratas en régimen de privación alimenticio, justo antes del momento de administración de alimento (Goto et al., 2001). Un estudio reciente del grupo de Sherie Ma (2017), ha mostrado que la activación mediante inyecciones de CNO (Clozapina-N-Óxido) en ratas a las que se les había suministrado el DREADD excitador hM3Dq en NI, produce desincronización electroencefalográfica cortical y elevados niveles de actividad theta hipocámpica. Estos cambios se han encontrado asociados a incrementos en el grado de atención de los animales y un aumento de la locomoción. Adicionalmente, se ha visto que los animales activados por CNO en paradigmas de miedo condicionado, presentaban respuestas alteradas definidas por un mayor movimiento de la cabeza, lo que puede ser entendido como un mayor reconocimiento del entorno, y por comportamientos de alerta durante el recordatorio del condicionamiento. Se sabe que la actividad theta está potenciada en los periodos de alto nivel de *arousal*, como durante periodos de vigilia activa, y disminuida durante periodos de baja actividad, como en vigilia tranquila o comportamientos repetitivos (Vanderwolf, 1969; Buzsáki, 2002). También es característica la presencia de la oscilación theta en el estado activo del sueño, el REM. El flujo colinérgico desde los núcleos PPT y LDT es máximo en este estado y en el hipocampo se produce una reactivación de ensamblajes neuronales activados durante la vigilia (Louie y Wilson, 2001). De acuerdo con Hutchison y Rathore (2015), es en esta fase del sueño cuando se produce la consolidación de recuerdos emocionalmente relevantes en el hipocampo. Por lo que las observaciones no publicadas de nuestro grupo que corroboran la existencia de actividad theta en el NI, acoplada a la del hipocampo, también en este estado, apoyan la participación del NI en este proceso.

Nuestros resultados integran al NI como un nodo imprescindible en el sistema de respuesta comportamental al estrés mediante su patrón de conexiones. Ante un incremento de CRH, debido a una situación de estrés, el NI sería capaz de modular la aten-

ción, el procesamiento cognitivo y las respuestas comportamentales y emocionales. Principalmente, esta respuesta sería llevada a cabo mediante las neuronas de proyección relaxina-3 positivas. En este sentido, una inhibición regular por parte de las neuronas tipo III sobre las neuronas parvalbúmina de proyección de MS/DB, permitiría regular la respuesta hipocámpica mediante el reinicio y mantenimiento de la actividad theta presente en situaciones de elevada carga atencional. Por todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el NI es una estructura clave en el procesamiento cognitivo que lleva a cabo el hipocampo, pudiendo mediar en la vía de respuesta a la exposición a estímulos relevantes.

CONCLUSIONES

- I. El núcleo incertus presenta una población neuronal, denominada neuronas tipo III, con poca actividad basal en anestesia con uretano, que adquiere actividad neuronal regular a frecuencia theta durante periodos de presencia de actividad theta hipocámpica.
- II. Las distintas neuronas del núcleo incertus incrementan su tasa de disparo con la aparición de actividad theta hipocámpica, poniendo de manifiesto su relación con los estados activos del hipocampo.
- III. La actividad de las neuronas tipo III del núcleo incertus se encuentra acoplada a la actividad theta hipocámpica.
- IV. La activación colinérgica del núcleo reticular pontino oral genera actividad oscilatoria a frecuencia theta en el núcleo incertus, con un elevado acoplamiento mantenido en el tiempo con la oscilación theta del hipocampo.
- V. Durante los momentos de actividad poblacional theta, el núcleo incertus presenta un flujo causal de información en sentido predominante hacia el hipocampo.
- VI. La inactivación del núcleo incertus es capaz de disminuir significativamente la actividad theta hipocámpica evocada mediante estimulación sensorial del animal.
- VII. Las distintas poblaciones neuronales del núcleo incertus presentan diferentes relaciones causales con el hipocampo durante los periodos de actividad theta.
- VIII. Las neuronas tipo I y II muestran causalidad predominante en el sentido hipocampo a núcleo incertus.
- IX. Las neuronas tipo III muestran un flujo causal en sentido núcleo incertus a hipocampo, lo que sugiere que las neuronas tipo III del núcleo incertus son capaces de predecir la oscilación theta hipocámpica.

- X. Un único pulso eléctrico en el núcleo incertus, no solo es capaz de generar potencia theta evocada en el hipocampo, sino que es capaz de reiniciar la fase de la oscilación theta presente en el hipocampo.
- XI. La modulación de la actividad theta hipocámpica evocada por la estimulación eléctrica del núcleo incertus es dependiente de la integridad del septum medial.
- XII. El núcleo incertus forma parte esencial de un circuito neuronal distribuido, implicado en la generación y reinicio de la oscilación theta hipocámpica.

BIBLIOGRAFÍA

- Adey, W. Hippocampal states and functional relations with corticocortical systems in attention and learning. *Progress in brain research*, 27:228–245, 1967. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4865089>.
- Adey, W., Dunlop, C., y Hendrix, C. Hippocampal slow waves. Distribution and phase relationships in the course of approach learning. *Archives of neurology*, 3:74–90, 1960. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13791882>.
- Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6):716–723, 1974. URL <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs{all}.jsp?arnumber=1100705>.
- Akam, T. y Kullmann, D. Efficient Communication through Coherence Requires Oscillations Structured to Minimize Interference between Signals. *PLoS Computational Biology*, 8(11):1–15, 2012. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1002760.g006>.
- Allen, J. Short term spectral analysis, synthesis, and modification by discrete Fourier transform. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 25(3):235–238, 1977. URL <http://148.204.64.201/paginasanexas/voz/articulosinteresantes/IEEEPOSS/3.pdf>.
- Alonso, A. y García-Austt, E. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. I. Laminar distribution of theta field potentials. *Experimental brain research*, 67(3):493–501, 1987a. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3653311>.
- Alonso, A. y García-Austt, E. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. II. Phase relations between unit discharges and theta field potentials. *Experimental brain research*, 67(3):502–509, 1987b. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3653312>.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., y O'Keefe, J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, 2007. ISBN 9780195100273. URL <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001/acprof-9780195100273>.
- Apartis, E., Poindessous-Jazat, F., Lamour, Y., y Bassant, M. Loss of rhythmically bursting neurons in rat medial septum following selective lesion of septohippocampal cholinergic system. *Journal of neurophysiology*, 79(4):1633–1642, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535934>.
- Arnsten, A. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6):410–422, 2009. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455173>.

- Assaf, S. y Miller, J. The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience*, 3(6):539–550, 1978. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/151244>.
- Başar, E., Başar-Eroglu, C., Karakaş, S., y Schürmann, M. Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *International Journal of Psychophysiology*, 39(Jan):2–3, 2001. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gamma%2C+alpha%2C+delta%2C+and+theta+oscillations+govern+cognitive+processes>.
- Banerjee, A., Shen, P., Ma, S., Bathgate, R., y Gundlach, A. Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology*, 58(1):145–155, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560474>.
- Barrenechea, C., Pedemonte, M., Núñez, A., y García-Austt, E. In vivo intracellular recordings of medial septal and diagonal band of Broca neurons: relationships with theta rhythm. *Experimental Brain Research*, 103(1):31–40, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615035>.
- Bassant, M. y Poindessous-Jazat, F. Ventral tegmental nucleus of Gudden: a pontine hippocampal theta generator? *Hippocampus*, 11(6):809–813, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11811675>.
- Battaglia, F., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C., y Wiener, S. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends in cognitive sciences*, 15(7):310–318, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696996>.
- Benchenane, K., Peyrache, A., Khamassi, M., Tierney, P., Gioanni, Y., Battaglia, F., y Wiener, S. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning. *Neuron*, 66(6):921–936, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620877>.
- Benchenane, K., Tiesinga, P., y Battaglia, F. Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention. *Current opinion in neurobiology*, 21(3):475–485, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429736>.
- Bender, F., Gorbati, M., Cadavieco, M., Denisova, N., Gao, X., Holman, C., Korotkova, T., y Ponomarenko, A. Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nature Communications*, 6(May):1–11, 2015. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms9521>.
- Berens, P. CircStat : A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. *Journal of Statistical Software*, 31(10):1–21, 2009. URL [http://kyb.mpg.de/publications/attachments/J-Stat-Softw-2009-Berens{ }6037\[0\].pdf](http://kyb.mpg.de/publications/attachments/J-Stat-Softw-2009-Berens{ }6037[0].pdf).

- Berger, H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 87(1):527–570, 1929. URL <http://link.springer.com/article/10.1007%2F01797193?LI=true>.
- Berry, S. y Seager, M. Hippocampal theta oscillations and classical conditioning. *Neurobiology of learning and memory*, 76(3):298–313, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726239>.
- Bienvenu, T., Busti, D., Magill, P., Ferraguti, F., y Capogna, M. Cell-Type-Specific Recruitment of Amygdala Interneurons to Hippocampal Theta Rhythm and Noxious Stimuli In Vivo. *Neuron*, 74(6):1059–1074, 2012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726836>.
- Bittencourt, J. y Sawchenko, P. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(3):1142–1156, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648719>.
- Bland, B. y Colom, L. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Progress in neurobiology*, 41(2):157–208, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8332751>.
- Bland, B. y Oddie, S. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 22(2):259–273, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579317>.
- Bland, B. y Oddie, S. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behavioural brain research*, 127(1-2):119–136, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11718888>.
- Bland, B., Oddie, S., Colom, L., y Vertes, R. Extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 4(6):649–660, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704109>.
- Bland, B., Konopacki, J., Kirk, I., Oddie, S., y Dickson, C. Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *Journal of neurophysiology*, 74(1):322–333, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472334>.
- Bland, B., Trepel, C., Oddie, S., y Kirk, I. Intraseptal microinfusion of muscimol: effects on hippocampal formation theta field activity and phasic theta-ON cell discharges. *Experimental neurology*, 138(2):286–97, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620927>.
- Bland, B., Oddie, S., y Colom, L. Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(8):3223–3237, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191335>.

- Bliss, T. y Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2):331–356, 1973. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4727084>.
- Bocian, R. y Konopacki, J. Effect of posterior hypothalamic injection of procaine on the hippocampal theta rhythm in freely moving cats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 61(2):125–134, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11512410>.
- Bocian, R. y Konopacki, J. The effect of posterior hypothalamic injection of cholinergic agents on hippocampal formation theta in freely moving cat. *Brain research bulletin*, 63(4):283–294, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196653>.
- Bocian, R. y Konopacki, J. Posterior hypothalamic GABAergic mediation of hippocampal theta in the cat. *Brain research bulletin*, 73(4-6):289–300, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562395>.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., y Jaffard, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, 400(August):671–675, 1999. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/23270>.
- Borhegyi, Z., Maglóczy, Z., Acsády, L., y Freund, T. The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience*, 82(4):1053–1065, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452297003011>.
- Borhegyi, Z., Varga, V., Szilágyi, N., Fabo, D., y Freund, T. Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(39):8470–8479, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456820>.
- Bourgin, P., Escourrou, P., Gaultier, C., y Adrien, J. Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. *Neuroreport*, 6(3):532–536, 1995. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7766858>.
- Bragin, A., Jandó, G., Nádasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., y Buzsáki, G. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1):47–60, 1995.
- Brankač, J., Stewart, M., y Fox, S. Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Research*, 615(2):310–327, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364740>.
- Brazhnik, E. y Fox, S. Intracellular recordings from medial septal neurons during hippocampal theta rhythm. *Experimental Brain Research*, 114(3):442–453, 1997. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187280>.

- Brazhnik, E. y Vinogradova, O. Modulation of the afferent input to the septal neurons by cholinergic drugs. *Brain research*, 451(1-2):1–12, 1988. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3251575>.
- Brazhnik, E., Vinogradova, O., y Karanov, A. Frequency modulation of neuronal theta-bursts in rabbit's septum by low-frequency repetitive stimulation of the afferent pathways. *Neuroscience*, 14(2):501–508, 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3873021>.
- Bressler, S. y Seth, A. Wiener-Granger causality: a well established methodology. *NeuroImage*, 58(2):323–329, 2011. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811910002272>.
- Bressler, S., Tang, W., Sylvester, C., Shulman, G., y Corbetta, M. Top-down control of human visual cortex by frontal and parietal cortex in anticipatory visual spatial attention. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(40):10056–10061, 2008. URL <http://www.jneurosci.org/content/28/40/10056.full>.
- Briggs, F. Patterned activity within the local cortical architecture. *Frontiers in Neuroscience*, 4(September):1–5, 2010. URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2010.00018/abstract>.
- Brodal, A. y Rossi, G. Ascending fibers in brain stem reticular formation of cat. *A.M.A. archives of neurology and psychiatry*, 74(1):68–87, 1955. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14387333>.
- Bullitt, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 296(4):517–530, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113539>.
- Bullock, T., Buzsáki, G., y McClune, M. Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus in freely-moving rats. *Neuroscience*, 38(3):609–619, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2270136>.
- Buño, W., García-Sánchez, J., y García-Austt, E. Reset of hippocampal rhythmical activities by afferent stimulation. *Brain research bulletin*, 3(1):21–28, 1978. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/630419>.
- Burazin, T., Bathgate, R., Macris, M., Layfield, S., Gundlach, A., y Tregear, G. Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain. *Journal of Neurochemistry*, 82(6):1553–1557, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354304>.
- Buzsáki, G. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, 33(3):325–340, 2002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662730200586X>.
- Buzsáki, G. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, 304(5679):1926–1929, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218136>.

- Buzsáki, G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, 15(7):827–40, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149082>.
- Buzsáki, G. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006. ISBN 9780195301069. URL <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001/acprof-9780195301069>.
- Buzsáki, G. Neural syntax: cell assemblies, synapsembles and readers. 68(3):362–385, 2011.
- Buzsáki, G. y Watson, B. Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(4):345–367, 2012. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393413>.
- Buzsáki, G., Lai-Wo S., L., y Vanderwolf, C. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat, 1983. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357356>.
- Buzsáki, G., Penttonen, M., Bragin, A., Nádasdy, Z., y Chrobak, J. Possible physiological role of the perforant path-CA1 projection. *Hippocampus*, 5(2):141–146, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7633517>.
- Buzsáki, G., Buhl, D., Harris, K., Csicsvari, J., Czéh, B., y Morozov, A. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 116(1):201–211, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535953>.
- Buzsáki, G., Logothetis, N., y Singer, W. Scaling Brain Size, Keeping Timing: Evolutionary Preservation of Brain Rhythms. *Neuron*, 80(3):751–764, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183025>.
- Cajal, S. *Estructura del asta de Ammon y fascia dentata*. 1893. URL <http://books.google.es/books/about/Estructura{ }del{ }asta{ }de{ }Ammon{ }y{ }fascia{ }de.html?id=6V14uAAACAAJ{ }&pgis=1>.
- Canavier, C. Phase-resetting as a tool of information transmission, 2015.
- Canteras, N. y Swanson, L. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 324(2):180–194, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1430328>.
- Caton, R. Forty-Third Annual Meeting of the British Medical Association. *BMJ*, 2(765):257–279, 1875. URL <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.2.765.257>.

- Cavanagh, J., Frank, M., Klein, T., y Allen, J. Frontal theta links prediction errors to behavioral adaptation in reinforcement learning. *NeuroImage*, 49(4):3198–3209, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969093>.
- Cervera-Ferri, A., Guerrero-Martínez, J., Bataller-Mompeán, M., Taberner-Cortes, A., Martínez-Ricós, J., Ruiz-Torner, A., y Teruel-Martí, V. Theta synchronization between the hippocampus and the nucleus incertus in urethane-anesthetized rats. *Experimental Brain Research*, 211(2):177–192, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479657>.
- Cervera-Ferri, A., Rahmani, Y., Martínez-Bellver, S., Teruel-Martí, V., y Martínez-Ricós, J. Glutamatergic projection from the nucleus incertus to the septohippocampal system. *Neuroscience Letters*, 517(2):71–76, 2012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521581>.
- Chalmers, D., López, J., Vázquez, D., Akil, H., y Watson, S. Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor gene expression by dexamethasone. *Neuropsychopharmacology*, 10(3):215–222, 1994. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916919>.
- Chalmers, D., Lovenberg, T., y De Souza, E. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF₂) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF₁ receptor mRNA expression. *The Journal of Neuroscience*, 15(10):6340–6350, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472399>.
- Chronwall, B., Skirboll, L., y O'Donohue, T. Demonstration of a pontine-hippocampal projection containing a ranatensin-like peptide. *Neuroscience Letters*, 53(1):109–114, 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3887223>.
- Clemens, Z., Mölle, M., Barsi, P., Halasz, P., y Born, J. Temporal coupling of parahippocampal ripples, sleep spindles and slow oscillations in humans. *Brain*, 130(11):2868–2878, 2007. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Clemens+2007+sleep+slow+waves+ripples>.
- Cocatre-Zilgien, J. y Delcomyn, F. Identification of bursts in spike trains. *Journal of Neuroscience Methods*, 41(1):19–30, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1578899>.
- Colgin, L. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Current opinion in neurobiology*, 21(3):467–474, 2011. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3578407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Colgin, L. Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annual review of neuroscience*, 36:295–312, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724998>.
- Colgin, L. y Moser, E. Hippocampal theta rhythms follow the beat of their own drum. *Nature Neuroscience*, 12(12):1483–1484, 2009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935726>.

- Colom, L., Castaneda, M., Reyna, T., Hernandez, S., y Garrido-Sanabria, E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse*, 58(3):151–164, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16108008>.
- Colom, L., García-Hernández, A., Castaneda, M., Perez-Cordova, M., y Garrido-Sanabria, E. Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *Journal of neurophysiology*, 95(6):3645–3653, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554504>.
- Condé, F., Audinat, E., Maire-Lepoivre, E., y Crépel, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain research bulletin*, 24(3):341–354, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2337814>.
- Condé, F., Maire-lepoivre, E., Audinat, E., y Crépel, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 352(4):567–593, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722001>.
- Contestabile, R. y Flumerfelt, B. Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: An HRP study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 196(2):253–270, 1981. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7217357>.
- Crutcher, K., Madison, R., y Davis, J. A study of the rat septohippocampal pathway using anterograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience*, 6(10):1961–1973, 1981. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272155>.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, A., Mamiya, A., y Buzsáki, G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *The Journal of neuroscience*, 19(1):274–287, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870957>.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A., y Buzsáki, G. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron*, 28(2):585–594, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144366>.
- Cullinan, W., Herman, J., Battaglia, D., Akil, H., y Watson, S. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, 64(2):477–505, 1995. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306452294003559>.
- Dallman, M., Pecoraro, N., La Fleur, S., Warne, J., Ginsberg, A., Akana, S., Laugero, K., Houshyar, H., Strack, A., Bhatnagar, S., y Bell, M. Chapter 4: Glucocorticoids, chronic stress, and obesity, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876569>.
- Denham, M. y Borisyyuk, R. A model of theta rhythm production in the septal-hippocampal system and its modulation by ascending brain

- stem pathways. *Hippocampus*, 10(6):698–716, 2000. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153716>.
- Deshpande, G., Sathian, K., y Hu, X. Effect of hemodynamic variability on Granger causality analysis of fMRI. *NeuroImage*, 52(3):884–896, 2010. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3098126&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Destexhe, A. y Sejnowski, T. Interactions Between Membrane Conductances Underlying Thalamocortical Slow-Wave Oscillations. *Physiological Reviews*, 83(4):1401–1453, 2003. URL <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00012.2003>.
- Diekelmann, S. Sleep for cognitive enhancement. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(April):1–12, 2014. URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2014.00046/abstract>.
- Ding, L., Worrell, G., Lagerlund, T., y He, B. Spatio-temporal Source Localization and Granger Causality in Ictal Source Analysis. In *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, volume 1, pages 3670–3671. IEEE, 2006. ISBN 1-4244-0032-5. URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/4462594/>.
- Douglas, R. y Goddard, G. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Research*, 86(2):205–215, 1975. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/163667>.
- Dragoi, G. y Buzsáki, G. Temporal Encoding of Place Sequences by Hippocampal Cell Assemblies. *Neuron*, 50(1):145–157, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600862>.
- Dragoi, G., Harris, K., y Buzsáki, G. Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron*, 39(5):843–853, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948450>.
- Drever, B., Riedel, G., y Platt, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural Brain Research*, 221(2):505–514, 2011. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21130117>.
- Duda, R., Hart, P., y Stork, D. *Pattern Classification*. Wiley, 2000. ISBN 0471056693.
- Eckhorn, R., Bauer, R., Jordan, W., Brosch, M., Kruse, W., Munk, M., y Reitboeck, H. Coherent oscillations: A mechanism of feature linking in the visual cortex? - Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biological Cybernetics*, 60(2):121–130, 1988. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3228555>.
- Eichenbaum, H. Hippocampus: Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory The hippocampus serves a critical role in declarative. *Neuron*, 44:109–120, 2004.

- Ekstrom, A., Caplan, J., Ho, E., Shattuck, K., Fried, I., y Kahana, M. Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus*, 15(7):881–889, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16114040>.
- Engel, A., Fries, P., y Singer, W. Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10):704–716, 2001. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35094565>.
- Farge, M. Wavelet transforms and their applications to turbulence. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 24(1991):395–457, 1992. URL <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.fl.24.010192.002143>.
- Faris, P. y Sainsbury, R. The role of the pontis oralis in the generation of RSA activity in the hippocampus of the guinea pig. *Physiology & behavior*, 47(6):1193–1199, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2395925>.
- Farooq, U., Rajkumar, R., Sukumaran, S., Wu, Y., Tan, W., y Dawe, G. Corticotropin-releasing factor infusion into nucleus incertus suppresses medial prefrontal cortical activity and hippocampo-medial prefrontal cortical long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, 38(4):2516–2525, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668693>.
- Farooq, U., Kumar, J., Rajkumar, R., y Dawe, G. Electrical microstimulation of the nucleus incertus induces forward locomotion and rotation in rats. *Physiological Behaviour*, 160(Jun):50–58, 2016. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049117>.
- Fell, J. y Axmacher, N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2):105–118, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248789>.
- Felleman, D. y Van Essen, D. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral cortex*, 1(1):1–47, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1822724>.
- Fisahn, A., Pike, F., Buhl, E., y Paulsen, O. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*, 394(6689):186–189, 1998. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=9671302>.
- Fisher, N. Analysis of data with temporal or spatial structure. In *Statistical Analysis of Circular Data*. Cambridge University Press, Cambridge, 1993. ISBN 0521568900. URL <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=wGPj3EoFdJwC&pgis=1>.
- Fonoff, E., Silva, C., Ballester, G., y Timo-Iaria, C. Electro-oscillographic correlation between dorsal raphe nucleus, neocortex and hippocampus during wakefulness before and after serotonergic inactivation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(4):469–472, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347812>.

- Fox, S., Wolfson, S., y Ranck, J. Hippocampal theta rhythm and the firing of neurons in walking and urethane anesthetized rats. *Experimental Brain Research*, 62(3):495–508, 1986. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3720881>.
- Freeman, J. y Dale, R. Assessing bimodality to detect the presence of a dual cognitive process. *Behavior research methods*, 45(1):83–97, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806703>.
- Freiwald, W., Valdes, P., Bosch, J., Biscay, R., Jimenez, J., Rodriguez, L., Rodriguez, V., Kreiter, A., y Singer, W. Testing non-linearity and directedness of interactions between neural groups in the macaque inferotemporal cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 94(1):105–119, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638819>.
- Freund, T. y Antal, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336(6195):170–173, 1988. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/336170a0>.
- Fries, P. Modulation of Oscillatory Neuronal Synchronization by Selective Visual Attention. *Science*, 291(5508):1560–1563, 2001. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1055465>.
- Fries, P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(10):474–480, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150631>.
- Gabbott, P., Warner, T., Jays, P., Salway, P., y Busby, S. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology*, 492(2):145–177, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16196030>.
- García-Sánchez, J., Buño, W., Fuentes, J., y García-Austt, E. Non-rhythmical hippocampal units, theta rhythm and afferent stimulation. *Brain research bulletin*, 3(3):213–219, 1978. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/709383>.
- Gaztelu, J. y Buño, W. Septo-hippocampal relationships during EEG theta rhythm. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 54(4):375–387, 1982. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6181960>.
- Ge, T., Feng, J., Grabenhorst, F., y Rolls, E. Componential Granger causality, and its application to identifying the source and mechanisms of the top-down biased activation that controls attention to affective vs sensory processing. *NeuroImage*, 59(2):1846–1858, 2012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21888980>.
- Geweke, J. Measurement of Linear Dependence and Feedback between Multiple Time Series. *Journal of the American Statistical Association*, 77(378):304–313, 1982. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1982.10477803>.

- Giraud, A. y Poeppel, D. Cortical oscillations and speech processing: emerging computational principles and operations. *Nature Neuroscience*, 15(4):511–517, 2012. URL [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Giraud+A.+L.%2C+Poeppel+D.+\(2012\).+Cortical+oscillations+and+speech+processing%3A+emerging+computational+principles+and+operations](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Giraud+A.+L.%2C+Poeppel+D.+(2012).+Cortical+oscillations+and+speech+processing%3A+emerging+computational+principles+and+operations).
- Givens, B. Stimulus-evoked resetting of the dentate theta rhythm: relation to working memory. *Neuroreport*, 8(1):159–163, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051772>.
- Glass, L. Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature*, 410(March):277–284, 2001. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v410/n6825/abs/410277a0.html>.
- Gogolák, G., Stumpf, C., Petsche, H., y Seterc, J. The firing pattern of septal neurons and the form of the hippocampal theta wave. *Brain Research*, 7(2):201–207, 1968. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689936890098X>.
- Gonzalo-Ruiz, A., Morte, L., Flecha, J., y Sanz, J. Neurotransmitter characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. *Anatomy and Embryology*, 200(4):377–392, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460475>.
- Goto, M. Effects of 5-hydroxytryptamine on neuronal activities in the rat dorsolateral septal nucleus. *The Kurume medical journal*, 45(4):301–312, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914716>.
- Goto, M., Swanson, L., y Canteras, N. Connections of the nucleus incertus. *The Journal of comparative neurology*, 438(1):86–122, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503154>.
- Granger, C. Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-spectral Methods. *Econometrica*, 37(3):424–438, 1969. URL <http://www.jstor.org/stable/1912791>.
- Grastyan, E., Lissak, K., Madarasz, I., y Donhoffer, H. Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 11(3):409–430, 1959. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13663816>.
- Gray, C., König, P., Engel, A., y Singer, W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties., 1989. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/338334a0>.
- Gray, J. Medial septal lesions, hippocampal theta rhythm and the control of vibrissal movement in the freely moving rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 30(3):189–197, 1971. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4103140>.
- Green, J. y Arduini, A. Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*, 17(6):533–557, 1954. URL <http://jn.physiology.org/content/17/6/533.full-text.pdf+html>.

- Grinsted, A., Moore, J., y Jevrejeva, S. Application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series. *Nonlinear Processes in Geophysics*, 11(5/6):561–566, 2004. URL <http://www.isiprproducts.co>.
- Groenewegen, H., Ahlenius, S., Haber, S., Kowall, N., y Nauta, W. Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 249(1):65–102, 1986. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2426312>.
- Grofova, I. y Keane, S. Descending brainstem projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat. *Anatomy and Embryology*, 184(3):275–290, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1724358>.
- Gupta, A. Organizing Principles for a Diversity of GABAergic Interneurons and Synapses in the Neocortex. *Science*, 287(5451):273–278, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634775>.
- Hajszan, T., Alreja, M., y Leranth, C. Intrinsic vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive input to septohippocampal parvalbumin-containing neurons: Novel glutamatergic local circuit cells. *Hippocampus*, 14(4):499–509, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15224985>.
- Hallanger, A. y Wainer, B. Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 274(4):483–515, 1988. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464621>.
- Hammack, S., Richey, K., Schmid, M., LoPresti, M., Watkins, L., y Maier, S. The role of corticotropin-releasing hormone in the dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of uncontrollable stress. *Journal of Neuroscience*, 22(3):1020–1026, 2002. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826130>.
- Hanada, Y., Hallworth, N., Szgatti, T., Scarlett, D., y Bland, B. Distribution and analysis of hippocampal theta-related cells in the pontine region of the urethane-anesthetized rat. *Hippocampus*, 9(3):288–302, 1999. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401643>.
- Hangya, B. y Borhegyi, Z. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *The Journal of Neuroscience*, 29(25):8094–8102, 2009. URL <http://www.jneurosci.org/content/29/25/8094.short>.
- Harris, K., Csicsvari, J., Hirase, H., Dragoi, G., y Buzsáki, G. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature*, 424(6948):552–556, 2003. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01834>.
- Hasselmo, M. What is the function of hippocampal theta rhythm? Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus*, 15(7):936–949, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158423>.

- Hasselmo, M. Arc length coding by interference of theta frequency oscillations may underlie context-dependent hippocampal unit data and episodic memory function. *Learning & Memory*, 14(11):782–794, 2007. URL <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.686607>.
- Hasselmo, M. Temporally structured replay of neural activity in a model of entorhinal cortex, hippocampus and postsubiculum. *European Journal of Neuroscience*, 28(7):1301–1315, 2008. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1460-9568.2008.06437.x/full>.
- Hasselmo, M., Bodelón, C., y Wyble, B. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural computation*, 14(4):793–817, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936962>.
- Hayakawa, T. y Zyo, K. Comparative cytoarchitectonic study of guden's tegmental nuclei in some mammals. *The Journal of Comparative Neurology*, 216(3):233–244, 1983. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345599>.
- Hayakawa, T. y Zyo, K. Comparative anatomical study of the tegmentomammillary projections in some mammals: A horseradish peroxidase study. *Brain Research*, 300(2):335–349, 1984. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428701>.
- Hölscher, C., Anwyl, R., y Rowan, M. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *The Journal of neuroscience*, 17(16):6470–6477, 1997. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236254>.
- Huang, Y., Yang, S., Hu, Z., Liu, G., Zhou, W., y Zhang, Y. A new approach to location of the dentate gyrus and perforant path in rats/mice by landmarks on the skull. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 72(4):468–472, 2012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377276>.
- Huerta, P. y Lisman, J. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*, 15(5):1053–1063, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576649>.
- Hurtado, J., Rubchinsky, L., y Sigvardt, K. Statistical method for detection of phase-locking episodes in neural oscillations. *Journal of neurophysiology*, 91(4):1883–1898, 2004. URL <http://jn.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jn.00853.2003>.
- Hutcheon, B. y Yarom, Y. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in neurosciences*, 23(5):216–222, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782127>.
- Hutchison, I. y Rathore, S. The role of REM sleep theta activity in emotional memory. *Frontiers in Psychology*, 6(1):1439–1440, 2015. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483709>.

- Hwang, K., Velanova, K., y Luna, B. Strengthening of Top-Down Frontal Cognitive Control Networks Underlying the Development of Inhibitory Control: A Functional Magnetic Resonance Imaging Effective Connectivity Study. *Journal of Neuroscience*, 30(46):15535–15545, 2010. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2825-10.2010>.
- Hyman, J., Wyble, B., Goyal, V., Rossi, C., y Hasselmo, M. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. *The Journal of neuroscience*, 23(37):11725–11731, 2003. URL <http://www.jneurosci.org/content/23/37/11725.abstract>.
- Iñiguez, C., Gayoso, M., y Carreres, J. A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *Journal of neuroscience methods*, 13(1):77–86, 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3887046>.
- Jackson, J., Dickson, C., y Bland, B. Median raphe stimulation disrupts hippocampal theta via rapid inhibition and state-dependent phase reset of theta-related neural circuitry. *Journal of neurophysiology*, 99(6):3009–3026, 2008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436639>.
- Jennes, L., Stumpf, W., y Kalivas, P. Neurotensin: Topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 210(3):211–224, 1982. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.902100302>.
- Jiao, Q., Lu, G., Zhang, Z., Zhong, Y., Wang, Z., Guo, Y., Li, K., Ding, M., y Liu, Y. Granger causal influence predicts BOLD activity levels in the default mode network. *Human brain mapping*, 32(1):154–161, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157880>.
- Jones, B. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience*, 40(3):637–656, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062436>.
- Jones, B. Arousal systems. *Frontiers in bioscience*, 8:438–451, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700104>.
- Jones, B. From waking to sleeping: Neuronal and chemical substrates, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183137>.
- Jones, B. y Muhlethale, M. *Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms: Chapter 14*. CRC Press, 1998.
- Jouvet, M. Biogenic Amines and the States of Sleep. *Science*, 163(3862):32–41, 1969. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.163.3862.32>.
- Juergens, E., Guettler, A., y Eckhorn, R. Visual stimulation elicits locked and induced gamma oscillations in monkey intracortical- and EEG-potentials, but not in human EEG. *Experimental brain research*, 129(2):247–259, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591899>.

- Jung, R. y Kornmuller, A. Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Arch Psychiatr*, 109:1–30, 1938.
- Kahana, M., Seelig, D., y Madsen, J. Theta returns. *Current opinion in neurobiology*, 11(6):739–744, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741027>.
- Kamiński, M. y Blinowska, K. A new method of the description of the information flow in the brain structures. *Biological cybernetics*, 65(3):203–210, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912013>.
- Kamondi, A., Acsády, L., Wang, X., y Buzsáki, G. Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus*, 261(March):244–261, 1998. URL [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3%3C244::AID-HIP07%3E3.0.CO;2-J/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3%3C244::AID-HIP07%3E3.0.CO;2-J/full).
- Kemp, I. y Kaada, B. The relation of hippocampal theta activity to arousal, attentive behaviour and somato-motor movements in unrestrained cats. *Brain research*, 95(2-3):323–342, 1975. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168940>.
- Kinney, G., Kocsis, B., y Vertes, R. Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology*, 120(3):244–248, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524970>.
- Kirk, I. y Mackay, J. The role of theta-range oscillations in synchronising and integrating activity in distributed mnemonic networks. *Cortex*, 39(4-5):993–1008, 2003. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14584563>.
- Kirk, I. y McNaughton, N. Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport*, 2(11):723–725, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1810464>.
- Kirk, I. y McNaughton, N. Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus*, 3(4):517–525, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269041>.
- Kirk, I., Oddie, S., Konopacki, J., y Bland, B. Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *The Journal of neuroscience*, 16(17):5547–5554, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757266>.
- Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., y Yasui, Y. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 496(3):349–368, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566004>.

- Kiss, J., Patel, A., Baimbridge, K., y Freund, T. Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience*, 36(1):61–72, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2215923>.
- Klemm, W. Effects of electric stimulation of brain stem reticular formation on hippocampal theta rhythm and muscle activity in unanesthetized, cervical- and midbrain-transected rats. *Brain Research*, 41(2):331–344, 1972. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4504547>.
- Klimesch, W., Freunberger, R., Sauseng, P., y Gruber, W. A short review of slow phase synchronization and memory: Evidence for control processes in different memory systems?, 2008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625208>.
- Kocsis, B. The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus. *Brain Research*, 1086(1):92–97, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616733>.
- Kocsis, B. y Kamiński, M. Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus*, 540:531–540, 2006. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20180/abstract>.
- Kocsis, B. y Vertes, R. Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *Journal of neurophysiology*, 68(4):1463–1467, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432093>.
- Kocsis, B. y Vertes, R. Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(11 Pt 2):7040–7052, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965097>.
- Koenig, J., Linder, A., Leutgeb, J., y Leutgeb, S. The Spatial Periodicity of Grid Cells Is Not Sustained During Reduced Theta Oscillations. *Science*, 332(6029):592–595, 2011. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1201685>.
- Konopacki, J., Gołbiewski, H., y Eckersdorf, B. Carbachol-induced theta-like activity in entorhinal cortex slices. *Brain research*, 572(1-2): 76–80, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351788>.
- Konopacki, J., Bocian, R., Kowalczyk, T., y Kłos-Wojtczak, P. The electrical coupling and the hippocampal formation theta rhythm in rats. *Brain Research Bulletin*, 107:1–17, 2014. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747291>.
- Koob, G. y Heinrichs, S. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain research*, 848

- (1-2):141–152, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612706>.
- Koyama, Y., Jodo, E., y Kayama, Y. Sensory responsiveness of "Broad-spike" neurons in the laterodorsal tegmental nucleus, locus coeruleus and dorsal raphe of awake rats: Implications for cholinergic and monoaminergic neuron-specific responses. *Neuroscience*, 63(4):1021–1031, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700507>.
- Kramis, R., Vanderwolf, C., y Bland, B. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Experimental Neurology*, 49(1):58–85, 1975. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014488675901958>.
- Kubota, Y., Inagaki, S., Shiosaka, S., Cho, H., Tateishi, K., Hashimura, E., Hamaoka, T., y Tohyama, M. The distribution of cholecystokinin octapeptide-like structures in the lower brain stem of the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 9(3):587–604, 1983. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6312372>.
- Kucewicz, M., Cimbalka, J., Matsumoto, J., Brinkmann, B., Bower, M., Vasoli, V., Sulc, V., Meyer, F., Marsh, W., Stead, S., y Worrell, G. High frequency oscillations are associated with cognitive processing in human recognition memory. *Brain*, 137(8):2231–2244, 2014. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24919972>.
- Kumar, J., Rajkumar, R., Lee, L., y Dawe, G. Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats: Involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*, 110(PtA):1–14, 2016. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436722>.
- Lachaux, J., Rodriguez, E., Martinerie, J., y Varela, F. Measuring phase synchrony in brain signals. *Human brain mapping*, 8(4):194–208, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619414>.
- Laughlin, S. y Sejnowski, T. Communication in Neuronal Networks. *Science*, 301(5641):1870–1874, 2003. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1089662>.
- Lawson, V. y Bland, B. The Role of the Septohippocampal Pathway in the Regulation of Hippocampal Field Activity and Behavior: Analysis by the Intraseptal Microinfusion of Carbachol, Atropine, and Procaine. *Experimental Neurology*, 120(1):132–144, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8477826>.
- Lawther, A., Clissold, M., Ma, S., Kent, S., Lowry, C., Gundlach, A., y Hale, M. Anxiogenic drug administration and elevated plus-maze exposure in rats activate populations of relaxin-3 neurons in the nucleus incertus and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 303(303):270–284, 2015. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26141847>.
- Lee, H., Rye, D., Hallanger, A., Levey, A., y Wainer, B. Cholinergic vs. noncholinergic efferents from the mesopontine tegmentum to the

- extrapyramidal motor system nuclei. *The Journal of comparative neurology*, 275(4):469–492, 1988. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461392>.
- Lein, P., Guo, X., Shi, G., Moholt-Siebert, M., Bruun, D., y Andres, D. The Novel GTPase Rit Differentially Regulates Axonal and Dendritic Growth. *Journal of Neuroscience*, 27(17):4725–4736, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17460085>.
- Leranth, C. y Kiss, J. A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. *The Journal of neuroscience*, 16(23):7699–7710, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922426>.
- Lesting, J., Geiger, M., Narayanan, R., Pape, H., y Seidenbecher, T. Impaired extinction of fear and maintained amygdala-hippocampal theta synchrony in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 52(2):337–346, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054349>.
- Lesting, J., Narayanan, R., Kluge, C., Sangha, S., Seidenbecher, T., y Pape, H. Patterns of Coupled Theta Activity in Amygdala-Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuits during Fear Extinction. *PLoS ONE*, 6(6):1–10, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738775>.
- Leung, L. Spectral analysis of hippocampal EEG in the freely moving rat: effects of centrally active drugs and relations to evoked potentials. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 60(1):65–77, 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578356>.
- Leung, L. y Yu, H. Theta-frequency resonance in hippocampal CA1 neurons in vitro demonstrated by sinusoidal current injection. *Journal of neurophysiology*, 79(3):1592–1596, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497437>.
- Lewicki, M. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Computation in Neural Systems*, 9(4):53–78, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221571>.
- Li, T., Gao, W., y Rao, Z. Noxious somatic stimulation-induced expression of Fos-like immunoreactivity in catecholaminergic neurons with habenular nucleus projection in the medullary visceral zone of rat. *Brain Research*, 783(1):51–56, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479045>.
- Li, X., Yao, X., Fox, J., y Jefferys, J. Interaction dynamics of neuronal oscillations analysed using wavelet transforms. *Journal of neuroscience methods*, 160(1):178–185, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973218>.
- Lisman, J. The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding

- scheme. *Hippocampus*, 15(7):913–922, 2005. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16161035>.
- Lisman, J. y Idiart, M. Storage of 7 ± 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science*, 267(March):1512–1515, 1995. URL <http://www.sciencemag.org/content/267/5203/1512.short>.
- Liu, Y., San Liang, X., y Weisberg, R. Rectification of the Bias in the Wavelet Power Spectrum. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, 24(12):2093–2102, 2007. URL <http://journals.ametsoc.org/doi/abs/10.1175/2007JTECH0511.1>.
- Llinas, R. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242(4886):1654–1664, 1988. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3059497>.
- Llinas, R. y Ribary, U. Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5):2078–2081, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446632>.
- Louie, K. y Wilson, M. Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron*, 29(1):145–156, 2001. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182087>.
- Lubenov, E. y Siapas, A. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature*, 459(7246):534–539, 2009. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08010>.
- Luo, Q., Ge, T., y Feng, J. Granger causality with signal-dependent noise. *NeuroImage*, 57(4):1422–1429, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645623>.
- Ma, S., Bonaventure, P., Ferraro, T., Shen, P., Burazin, T., Bathgate, R., Liu, C., Tregear, G., Sutton, S., y Gundlach, A. Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience*, 144(1):165–190, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071097>.
- Ma, S., Olucha-Bordonau, F., Hossain, M., Lin, F., Kuei, C., Liu, C., Wade, J., Sutton, S., Nuñez, A., y Gundlach, A. Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. *Learning and Memory*, 16(11):730–742, 2009. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880588>.
- Ma, S., Blasiak, A., Olucha-Bordonau, F., Verberne, A., y Gundlach, A. Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat. *The Journal of physiology*, 591(Pt 16):3981–4001, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671163>.
- Ma, S., Allocca, G., Ong-Pålsson, E., Singleton, C., Hawkes, D., McDougall, S., Williams, S., Bathgate, R., y Gundlach, A. Nucleus

- incertus promotes cortical desynchronization and behavioral arousal. *Brain Structure and Function*, 222(1):515–537, 2017. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206427>.
- Macadar, A., Chalupa, L., y Lindsley, D. Differentiation of brain stem loci which affect hippocampal and neocortical electrical activity. *Experimental neurology*, 43(3):499–514, 1974. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4597133>.
- Maggi, C. y Meli, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems Part 1: General considerations, 1986. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2868911>.
- Manns, I., Mainville, L., y Jones, B. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience*, 107(2):249–263, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731099>.
- Manns, J., Howard, M., y Eichenbaum, H. Gradual Changes in Hippocampal Activity Support Remembering the Order of Events. *Neuron*, 56(3):530–540, 2007. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627307006435>.
- Manseau, F., Danik, M., y Williams, S. A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *The Journal of Physiology*, 566(3):865–884, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919710>.
- Mark, G., Rada, P., y Shors, T. Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience*, 74(3):767–774, 1996. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=8884772>.
- Marshall, L., Henze, D., Hirase, H., Leinekugel, X., Dragoi, G., y Buzsáki, G. Hippocampal pyramidal cell-interneuron spike transmission is frequency dependent and responsible for place modulation of interneuron discharge. *The Journal of neuroscience*, 22(2):1–5, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784809>.
- Maru, E., Takahashi, L., y Iwahara, S. Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Research*, 163(2):223–234, 1979. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218681>.
- Maxwell, J. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 155:459–512, 1865. URL <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1865.0008>.
- McCartney, H., Johnson, A., Weil, Z., y Givens, B. Theta reset produces optimal conditions for long-term potentiation. *Hippocampus*, 14(6):684–687, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318327>.

- McDonald, A. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3):257–332, 1998. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000033>.
- McDonald, A. y Mascagni, F. Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 77(2):445–459, 1997. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452296004782>.
- McKenna, J. y Vertes, R. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *The Journal of comparative neurology*, 480(2):115–142, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514932>.
- McNaughton, N., Logan, B., Panickar, K., Kirk, I., Pan, W., Brown, N., y Heenan, A. Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus*, 5(6):534–545, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646280>.
- Mesulam, M. *Structure and Function of Cholinergic Pathways in the Cerebral Cortex, Limbic System, Basal Ganglia, and Thalamus of the Human Brain*. New York: Raven Press, 2005.
- Mesulam, M., Mufson, E., Levey, A., y Wainer, B. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: Cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (Substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 214(2):170–197, 1983. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6841683>.
- Miller, E., Li, L., y Desimone, R. A Neural Mechanism for Working and Recognition Memory in Inferior Temporal Cortex. *Science*, 254(November):10–12, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1962197>.
- Millett, D. Hans Berger: From Psychic Energy to the EEG. *Perspectives in Biology and Medicine*, 44(4):522–542, 2001. URL <http://muse.jhu.edu/content/crossref/journals/perspectives{-}in{-}biology{-}and{-}medicine/v044/44.4millett.html>.
- Milton, A. y Pleydell-Pearce, C. The phase of pre-stimulus alpha oscillations influences the visual perception of stimulus timing. *Neuroimage*, 133(Jun):53–61, 2016. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+phase+of+pre-stimulus+alpha+oscillations+influences+the+visual+perception+of+stimulus+timing>.
- Mirollo, R. y Steven, H. Synchronization of pulse-coupled biological oscillators*. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 50(6):1645–1662, 1990. URL [http://links.jstor.org/sici?sici=0036-1399\(199012\)50:3A6:3C1645:3AS0PB0:3E2.0.CO;3B2-2](http://links.jstor.org/sici?sici=0036-1399(199012)50:3A6:3C1645:3AS0PB0:3E2.0.CO;3B2-2).
- Mitchell, S. y Ranck, J. Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *Brain research*, 189(1):49–66, 1980. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7363097>.

- Mitzdorf, U. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiological reviews*, 65(1):37–100, 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3880898>.
- Miyamoto, Y., Watanabe, Y., y Tanaka, M. Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regulatory peptides*, 145(1-3):54–59, 2008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870193>.
- Mölle, M., Yeshenko, O., Marshall, L., Sara, S., y Born, J. Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *Journal of Neurophysiology*, 96(1):62–70, 2006. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611848>.
- Moita, M., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J., y Blair, H. Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning. *Neuron*, 37(3):485–497, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12575955>.
- Montgomery, S., Sirota, A., y Buzsáki, G. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *Journal of Neuroscience*, 28(26):6731–6741, 2008. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579747>.
- Montgomery, S., Betancur, M., y Buzsáki, G. Behavior-Dependent Coordination of Multiple Theta Dipoles in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 29(5):1381–1394, 2009. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4339-08.2009>.
- Moruzzi, G. y Magoun, H. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 1(4):455–473, 1949. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421835>.
- Moser, E., Kropff, E., y Moser, M. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31(Jul):68–89, 2008. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284371>.
- Muñoz, M., Núñez, A., y García-Austt, E. In vivo intracellular analysis of rat dentate granule cells. *Brain Research*, 509(1):91–98, 1990. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939090313Z>.
- Nerad, L. y McNaughton, N. The septal EEG suggests a distributed organization of the pacemaker of hippocampal theta in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 24(1):155–166, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882013>.
- Newman, E., Gupta, K., Climer, J., Monaghan, C., y Hasselmo, M. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6(June):1–19, 2012. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Niso, G., Bruña, R., Pereda, E., Gutiérrez, R., Bajo, R., Maestú, F., y Del-Pozo, F. HERMES: towards an integrated toolbox to characterize functional and effective brain connectivity. *Neuroinformatics*, 11(4):405–434, 2013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812847>.
- Nowacka, A., Jurkowlaniec, E., y Trojnar, W. Microinjection of procaine into the pedunculopontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Research Bulletin*, 58(4):377–384, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183014>.
- Núñez, A., de Andrés, I., y García-Austt, E. Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Experimental brain research*, 87(2):303–308, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1769384>.
- Núñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F., Ruiz-Torner, A., y Teruel-Martí, V. Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*, 23(10):2731–2738, 2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16817876>.
- Oddie, S., Bland, B., Colom, L., y Vertes, R. The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 4(4):454–473, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7874237>.
- O'Keefe, J. y Burgess, N. Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus*, 15(7):853–866, 2005. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2677681&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1):171–175, 1971. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>.
- O'Keefe, J. y Recce, M. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3):317–330, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8353611>.
- Olucha-Bordonau, F., Teruel-Martí, V., Barcia-González, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A., y Martínez-Soriano, F. Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 464(1):62–97, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866129>.
- Olucha-Bordonau, F., Otero-García, M., Sánchez-Pérez, A., Núñez, A., Ma, S., y Gundlach, A. Distribution and targets of the relaxin-3 innervation of the septal area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 520(9):1903–1939, 2012. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.23018>.

- Olvera-Cortés, E., Guevara, M., y González-Burgos, I. Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Research Bulletin*, 62(5):379–384, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168902>.
- O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., Dupret, D., y Csicsvari, J. Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends in Neurosciences*, 33(5):220–229, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207025>.
- Oprisan, S., Dix, S., y Buhusi, C. Phase resetting and its implications for interval timing with intruders. *Behavioural Processes*, 101(Jan):146–153, 2014. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113026>.
- Pan, W. y McNaughton, N. The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Progress in Neurobiology*, 74(3):127–166, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556285>.
- Paré, D. y Gaudreau, H. Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *The Journal of neuroscience*, 16(10):3334–3350, 1996. URL <http://www.jneurosci.org/content/16/10/3334.short>.
- Passerin, A., Cano, G., Rabin, B., Delano, B., Napier, J., y Sved, A. Role of locus coeruleus in foot shock-evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience*, 101(4):1071–1082, 2000. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Passerin+2000>.
- Pavlidis, C., Greenstein, Y., Grudman, M., y Winson, J. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of θ -rhythm. *Brain Research*, 439(1-2):383–387, 1988. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899388914990>.
- Paxinos, G. y Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*. Academic Press, 2004. ISBN 0080474128. URL <http://books.google.com/books?id=xzNyLkQ7-q0C{&}pgis=1>.
- Pedemonte, M., Rodríguez, A., y Velluti, R. Hippocampal theta waves as an electrocardiogram rhythm timer in paradoxical sleep. *Neuroscience letters*, 276(1):5–8, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586961>.
- Petrovich, G., Risold, P., y Swanson, L. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 374(3):387–420, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8906507>.
- Petsche, H. y Stumpf, C. The origin of theta-rhythm in the rabbit hippocampus. *Wiener klinische Wochenschrift*, 74:696–700, 1962. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13942954>.

- Petsche, H., Gogolák, G., y van Zwieten, P. Rhythmicity of septal cell discharges at various levels of reticular excitation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 19(1):25–33, 1965. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013469465900040>.
- Pfaff, D., Kieffer, B., y Swanson, L. Mechanisms for the regulation of state changes in the central nervous system: An introduction. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, volume 1129, pages 1–7, 2008. ISBN 1-57331-703-9\1978-1-57331-703-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591464>.
- Picciotto, M., Higley, M., y Mineur, Y. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1):116–129, 2012. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23040810>.
- Pinard, C., Mascagni, F., y McDonald, A. Medial prefrontal cortical innervation of the intercalated nuclear region of the amygdala. *Neuroscience*, 205(Mar):112–124, 2012. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=22249157>.
- Poch, C., Fuentemilla, L., Barnes, G., y Duzel, E. Hippocampal Theta-Phase Modulation of Replay Correlates with Configural-Relational Short-Term Memory Performance. *Journal of Neuroscience*, 31(19):7038–7042, 2011. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6305-10.2011>.
- Polanía, R., Nitsche, M., Korman, C., Batsikadze, G., y Paulus, W. The Importance of Timing in Segregated Theta Phase-Coupling for Cognitive Performance. *Current Biology*, 22(14):1314–1318, 2012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683259>.
- Potter, E., Behan, D., Linton, E., Lowry, P., Sawchenko, P., y Vale, W. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9):4192–4196, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315056>.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P., y Vale, W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19):8777–8781, 1994. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.19.8777>.
- Purves, D. *Neuroscience*. Sinauer, 2008. ISBN 0878936971. URL <https://books.google.ca/books/about/Neuroscience.html?id=0oZFQAIAAJ>.
- Rasch, B. y Born, J. About sleep's role in memory. *Physiological reviews*, 93(2):681–766, 2013. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3768102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Reinoso-Suárez, F., de Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M., y Garzón, M. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM

- sleep. *Sleep Medicine Reviews*, 5(1):63–77, 2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531045>.
- Reyes, A. Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nature Neuroscience*, 6(6):593–599, 2003. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn1056>.
- Ribeiro-Barbosa, E., Canteras, N., Cezário, A., Blanchard, R., y Blanchard, D. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8):1255–1263, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120464>.
- Rivas, J., Gaztelu, J., y García-Austt, E. Changes in hippocampal cell discharge patterns and theta rhythm spectral properties as a function of walking velocity in the guinea pig. *Experimental brain research*, 108(1):113–118, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721159>.
- Robbins, T. Controlling stress: how the brain protects itself from depression. *Nature Neuroscience*, (3):261–262.
- Rodrigo-Angulo, M., Rodríguez-Veiga, E., y Reinoso-Suarez, F. Serotonergic connections to the ventral oral pontine reticular nucleus: implication in paradoxical sleep modulation. *Journal of Comparative Neurology*, 418(1):93–105, 2000. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701758>.
- Roux, S., Cenier, T., Garcia, S., Litaudon, P., y Buonviso, N. A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *Journal of neuroscience methods*, 160(1):135–143, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049617>.
- Ryan, P., Ma, S., Olucha-Bordonau, F., y Gundlach, A. Nucleus incertus—an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(6):1326–1341, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329721>.
- Rye, D., Lee, H., Saper, C., y Wainer, B. Medullary and spinal efferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 269(3):315–341, 1988. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2453532>.
- Sainsbury, R. y Montoya, C. The relationship between type 2 theta and behavior. *Physiology & behavior*, 33(4):621–626, 1984. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6522481>.
- Sainsbury, R., Heynen, A., y Montoya, C. Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiology & behavior*, 39(4):513–519, 1987. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3575499>.
- Sánchez-Pérez, A., Arnal-Vicente, I., Santos, F., Pereira, C., ElMili, N., Sanjuan, J., Ma, S., Gundlach, A., y Olucha-Bordonau, F. Septal projections to nucleus incertus in the rat: Bidirectional pathways for modulation of hippocampal function. *Journal of Comparative Neurology*,

- 523(4):565–588, 2015. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269409>.
- Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B., Witter, M., Moser, M., y Moser, E. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*, 312(5774):758–762, 2006. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675704>.
- Sarnthein, J., Petsche, H., Rappelsberger, P., Shaw, G., y Von Stein, A. Synchronization between prefrontal and posterior association cortex during human working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12):7092–7096, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618544>.
- Sato, N. y Yamaguchi, Y. Online formation of a hierarchical cognitive map for object-place association by theta phase coding. *Hippocampus*, 15(7):963–978, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145691>.
- Sauseng, P., Klimesch, W., Doppelmayr, M., Hanslmayr, S., Schabus, M., y Gruber, W. Theta coupling in the human electroencephalogram during a working memory task. *Neuroscience Letters*, 354(2):123–126, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698454>.
- Scheffzük, C., Kukushka, V., Vyssotski, A., Draguhn, A., Tort, A., y Brankack, J. Selective coupling between theta phase and neocortical fast gamma oscillations during REM-sleep in mice. *PLoS One*, 6(12):1–9, 2011. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Scheffz%C3%BCk+2011>.
- Schippers, M., Roebroek, A., Renken, R., Nanetti, L., y Keysers, C. Mapping the information flow from one brain to another during gestural communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20):9388–9393, 2010. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1001791107>.
- Schreiber, T. y Schmitz, A. Surrogate time series. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 142(3-4):346–382, 2000. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167278900000439>.
- Schroeder, C. y Lakatos, F. Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection. *Trends in Neuroscience*, 32(1):9–18, 2009. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012975>.
- Scott, L., Feng, J., Kiss, T., Needle, E., Atchison, K., Kawabe, T., Milici, A., Hajós-Korcsok, E., Riddell, D., y Hajós, M. Age-dependent disruption in hippocampal theta oscillation in amyloid- β overproducing transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 33(7):13–23, 2012. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458011005422>.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T., Stork, O., y Pape, H. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301(5634):846–850, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907806>.

- Sejnowski, T. y Paulsen, O. Network Oscillations: Emerging Computational Principles. *Journal of Neuroscience*, 26(6):1673–1676, 2006. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3737-05d.2006>.
- Semba, K. y Fibiger, H. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: A retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*, 323(3):387–410, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281170>.
- Semba, K., Reiner, P. y Fibiger, H. Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience*, 38(3):643–654, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176719>.
- Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M. y Noguchi, K. Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain research bulletin*, 31(3-4):329–344, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490732>.
- Seth, A. A MATLAB toolbox for Granger causal connectivity analysis. *Journal of neuroscience methods*, 186(2):262–273, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961876>.
- Seth, A. y Edelman, G. Distinguishing causal interactions in neural populations. *Neural computation*, 19(4):910–933, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17348767>.
- Shannon, C. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3):379–423, 1948. URL <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6773024>.
- Shimazaki, H. y Shinomoto, S. Kernel bandwidth optimization in spike rate estimation. *Journal of computational neuroscience*, 29(1-2):171–182, 2010. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2940025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sik, A., Penttonen, M. y Buzsáki, G. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *European Journal of Neuroscience*, 9(3):573–588, 1997. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9104599>.
- Simões, C., Valle, A. y Timo-Iaria, C. Correlation between concomitant theta waves in nucleus reticularis pontis oralis and in hippocampus, thalamus and neocortex during dreaming in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, 29(12):1645–50, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9222426>.
- Singewald, N., Kovelas, D., Kaehler, S., Sinner, C. y Philippu, A. Peripheral chemoreceptor activation enhances 5-hydroxytryptamine release in the locus coeruleus of conscious rats. *Neuroscience Letters*, 289(1):17–20, 2000. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899398>.

- Sinnamon, H., Jassen, A., y Vita, L. Brainstem regions with neuronal activity patterns correlated with priming of locomotor stepping in the anesthetized rat. *Neuroscience*, 99(1):77–91, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924954>.
- Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M., y Buzsáki, G. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*, 60(4):683–697, 2008. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038224>.
- Skaggs, W., McNaughton, B., Wilson, M., y Barnes, C. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*, 6(2):149–172, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797016>.
- Sławińska, U. y Kasicki, S. The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain research*, 796(1-2):327–331, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689489>.
- Smith, C., Ryan, P., Hosken, I., Ma, S., y Gundlach, A. Relaxin-3 systems in the brain—the first 10 years. *Journal of chemical neuroanatomy*, 42(4):262–275, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693186>.
- Somogyi, P., Tamás, G., Lujan, R., y Buhl, E. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain research*, 26(2-3):113–135, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651498>.
- Squire, L. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3):171–177, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464402>.
- Staresina, B., Bergmann, T., Bonnefond, M., van der Meij, R., Jensen, O., Deuker, L., Elger, C., Axmacher, N., y Fell, J. Hierarchical nesting of slow oscillations, spindles and ripples in the human hippocampus during sleep. *Nature Neuroscience*, 18(11):1679–1686, 2015. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389842>.
- Steininger, T., Rye, D., y Wainer, B. Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies. *The Journal of comparative neurology*, 321(4):515–543, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380518>.
- Steriade, M., A. F. y Contreras, D. Synchronization of Fast (30-40 Hz) Spontaneous Intrathalamic and Thalamocortical Networks Oscillations in. 76(8):2788–2808, 1996.
- Steriade, M. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *Journal of neurophysiology*, 86(1):1–39, 2001. URL <http://jn.physiology.org/content/86/1/1.short>.
- Steriade, M. y Timofeev, I. Neuronal Plasticity in Thalamocortical Review Networks during Sleep and Waking Oscillations. 37:563–576, 2003.

- Steriade, M., Paré, D., y Oakson, G. Neuronal Activities in Brain-Stem Cholinergic Nuclei Related Activation Processes in Thalamocortical Systems to Tonic. *10(August):2541–2559*, 1990.
- Stewart, M. y Fox, S. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends in Neurosciences*, 13(5):163–169, 1990a. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016622369090040H>.
- Stewart, M. y Fox, S. Firing relations of lateral septal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized rats. *Experimental brain research*, 79(1):92–96, 1990b. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2311707>.
- Sutton, R., Koob, G., Le Moal, M., Rivier, J., y Vale, W. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature*, 297(5864):331–333, 1982. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6978997>.
- Sutton, S., Bonaventure, P., Kuei, C., Roland, B., Chen, J., Nepomuceno, D., Lovenberg, T., y Liu, C. Distribution of G-Protein-Coupled Receptor (GPCR)₁₃₅ Binding Sites and Receptor mRNA in the Rat Brain Suggests a Role for Relaxin-3 in Neuroendocrine and Sensory Processing. *Neuroendocrinology*, 80(5):298–307, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677880>.
- Swanson, L. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Research*, 217(1):150–154, 1981. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689938190192X>.
- Swanson, L. What is the brain? *Trends in neurosciences*, 23(11):519–527, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074261>.
- Swanson, L. y Petrovich, G. What is the amygdala? *Trends in neurosciences*, 21(8):323–331, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016622369801265X>.
- Swanson, L., Sawchenko, P., Rivier, J., y Vale, W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 36(3):165–186, 1983. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601247>.
- Szucs, A. Applications of the spike density function in analysis of neuronal firing patterns. *Journal of neuroscience methods*, 81(1-2):159–167, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696321>.
- Takano, Y. y Hanada, Y. The driving system for hippocampal theta in the brainstem: an examination by single neuron recording in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience letters*, 455(1):65–69, 2009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429108>.
- Takehara-Nishiuchi, K., Maal-Bared, G., y Morrissey, M. Increased Entorhinal-Prefrontal Theta Synchronization Parallels Decreased Entorhinal-Hippocampal Theta Synchronization during Learning and Consolidation of Associative Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(January):90, 2012. URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2011.00090/abstract>.

- Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N., y Nakanishi, S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(4):1372–1378, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463825>.
- Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., y Ibata, Y. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *European Journal of Neuroscience*, 21(6):1659–1670, 2005. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x>.
- Tasker, J. y Herman, J. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*, 14(4):398–406, 2011. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21663538%5Buid%5D>.
- Teruel-Martí, V., Cervera-Ferri, A., Núñez, A., Valverde-Navarro, A., Olucha-Bordonau, F., y Ruiz-Torner, A. Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain research*, 1218:87–96, 2008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514169>.
- Tesche, C. y Karhu, J. Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2):919–924, 2000. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=154311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Theiler, J., Eubank, S., Longtin, A., Galdrikian, B., y Doyne Farmer, J. Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 58(1-4):77–94, 1992. URL <http://tuvalu.santafe.edu/~jdf/papers/testingnonlinearity.pdf>.
- Thierry, A., Gioanni, Y., Dégénétais, E., y Glowinski, J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, 10(4):411–419, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985280>.
- Thomson, A. y West, D. Presynaptic frequency filtering in the gamma frequency band; dual intracellular recordings in slices of adult rat and cat neocortex. *Cerebral cortex*, 13(2):136–143, 2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507944>.
- Torrence, C. y Compo, G. A practical guide to wavelet analysis. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 79(1):61–78, 1998. URL [http://journals.ametsoc.org/doi/abs/10.1175/1520-0477\(1998\)079%3C0061:APGTWA%3E2.0.CO;2](http://journals.ametsoc.org/doi/abs/10.1175/1520-0477(1998)079%3C0061:APGTWA%3E2.0.CO;2).
- Torrence, C. y Webster, P. The annual cycle of persistence in the El Niño/Southern Oscillation. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 124(550):1985–2004, 1998. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/qj.49712455010/abstract>.

- Tulving, E. Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1):1–25, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752477>.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J., Chan, R., Li, H., Arias, C., Prins, G., Perrin, M., Vale, W., y Sawchenko, P. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of comparative neurology*, 428(2):191–212, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11064361>.
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., Freund, T., y Buzsáki, G. Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37):13535–13540, 2014. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197052>.
- Vanderwolf, C. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4):407–418, 1969. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013469469900923>.
- Varela, F., Lachaux, J., Rodriguez, E., y Martinerie, J. The brain-web: phase synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4):229–239, 2001. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/35067550>.
- Varga, V., Hangya, B., Kránitz, K., Ludányi, A., Zemankovics, R., Katona, I., Shigemoto, R., Freund, T., y Borhegyi, Z. The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *The Journal of physiology*, 586(16):3893–3915, 2008. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2538919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vertes, R. Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *Journal of neurophysiology*, 42(1 Pt 1):214–228, 1979. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/219157>.
- Vertes, R. An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *Journal of neurophysiology*, 46(5):1140–1159, 1981. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7299451>.
- Vertes, R. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4):643–668, 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1783685>.
- Vertes, R. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 326(4):595–622, 1992. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484125>.
- Vertes, R. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *The Journal of comparative neurology*, 442(2):163–187, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754169>.

- Vertes, R. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus*, 15(7):923–935, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149083>.
- Vertes, R. y Kocsis, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81(4):893–926, 1997. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030645229700239X>.
- Vertes, R., Martin, G., y Waltzer, R. An autoradiographic analysis of ascending projections from the medullary reticular formation in the rat. *Neuroscience*, 19(3):873–898, 1986. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3796820>.
- Vertes, R., Colom, L., Fortin, W., y Bland, B. Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Experimental brain research*, 96(3):419–429, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8299744>.
- Vertes, R., Crane, A., Colom, L., y Bland, B. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 359(1):90–116, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557849>.
- Vertes, R., Fortin, W., y Crane, A. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 407(4):555–582, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235645>.
- Viana Di Prisco, G., Albo, Z., Vertes, R., y Kocsis, B. Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Experimental brain research*, 145(3):383–394, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12136388>.
- Vinogradova, O., Brazhnik, E., Kichigina, V., y Stafekhina, V. Theta modulation of neurons of the hippocampus of the rabbit and its interrelationship with other parameters of spontaneous and evoked activity. *Neuroscience and behavioral physiology*, 23(3):226–239, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8332240>.
- Vinogradova, O., Brazhnik, E., Kichigina, V., y Stafekhina, V. Modulation of the reaction of hippocampal neurons to sensory stimuli by cholinergic substances. *Neuroscience and behavioral physiology*, 26(2):113–124, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782214>.
- Vinogradova, O., Kichigina, V., y Zenchenko, C. Pacemaker neurons of the forebrain medial septal area and theta rhythm of the hippocampus. *Membrane & cell biology*, 11(6):715–725, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718568>.
- Voloh, B. y Womelsdorf, T. A Role of Phase-Resetting in Coordinating Large Scale Neural Networks During Attention and Goal-Directed Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(Mar):10–18, 2016. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+Role+of+Phase-Resetting+in+Coordinating+Large+Scale+Neural+Networks+During+Attention+and+Goal-Directed+Behavior>.

- Wang, X. Pacemaker neurons for the theta rhythm and their synchronization in the septohippocampal reciprocal loop. *Journal of neurophysiology*, 87(2):889–900, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826054>.
- Whishaw, I. y Schallert, T. Hippocampal RSA (theta), apnea, bradycardia and effects of atropine during underwater swimming in the rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 42(3):389–396, 1977. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/65274>.
- Whishaw, I. y Vanderwolf, C. Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behavioral biology*, 8(4):461–484, 1973. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4350255>.
- Wiener, N. *Modern mathematics for the engineer: The theory of prediction*. McGraw-Hill, 1956. URL https://books.google.com.ag/books/about/Modern_mathematics_for_the_engineer.html?id=JeAdAQAAMAAJ.
- Williams, J. y Givens, B. Stimulation-induced reset of hippocampal theta in the freely performing rat. *Hippocampus*, 13(1):109–116, 2003. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.10082/abstract>.
- Wilson, M. y McNaughton, B. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, 265(5172):676–679, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036517>.
- Winson, J. Interspecies differences in the occurrence of theta. *Behavioral biology*, 7(4):479–487, 1972. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4340452>.
- Winson, J. y Abzug, C. Neuronal transmission through hippocampal pathways dependent on behavior. *Journal of Neurophysiology*, 41(3):716–732, 1978. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/207830>.
- Witter, M. Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*, 3:33–44, 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8287110>.
- Womelsdorf, T. y Fries, P. The role of neuronal synchronization in selective attention. *Current opinion in neurobiology*, 17(2):154–160, 2007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306527>.
- Woolf, N., Hernit, M., y Butcher, L. Cholinergic and non-cholinergic projections from the rat basal forebrain revealed by combined choline acetyltransferase and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin immunohistochemistry. *Neuroscience letters*, 66(3):281–286, 1986. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425289>.
- Young, C. K. y McNaughton, N. Coupling of theta oscillations between anterior and posterior midline cortex and with the hippocampus in freely behaving rats. *Cerebral cortex*, 19(1):24–40, 2009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453538>.

Zhang, H., Lin, S., y Nicolelis, M. Spatiotemporal Coupling between Hippocampal Acetylcholine Release and Theta Oscillations In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 30(40):13431–13440, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926669>.

NOTA SOBRE LA MAQUETACIÓN

Este documento ha sido maquetado con \LaTeX , con el paquete `classicthesis` desarrollado por André Miede. Este estilo ha sido inspirado por el libro de Robert Bringhurst sobre tipografía *“The Elements of Typographic Style”*.

`classicthesis` está disponible para \LaTeX y \LyX :

<https://bitbucket.org/amiede/classicthesis/>

Final Version as of 17 de mayo de 2017 (`classicthesis`).